

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 691**

51 Int. Cl.:

C12P 19/24 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C07C 45/81 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2014 PCT/KR2014/004970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14196811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2014 E 14807891 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3006568**

54 Título: **Procedimiento de producción de tagatosa**

30 Prioridad:

05.06.2013 KR 20130065002

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

01.04.2020

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, SUNG JAE;
KIM, YANG HEE;
KIM, SEONG BO;
PARK, SEUNG WON;
PARK, IL HYANG;
KIM, MIN HAE y
LEE, YOUNG MI**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 751 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de tagatosa

5 Campo Técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir tagatosa a partir de fructosa, más particularmente, a un procedimiento para producir tagatosa por medio de epimerización de fructosa en la posición C4.

10

Técnica antecedente

La tagatosa tiene un sabor dulce natural que es apenas distinguible de la sacarosa y tiene propiedades físicas similares a la sacarosa. Sin embargo, la tagatosa ingerida no se absorbe bien en el intestino delgado y por lo tanto tiene un impacto mínimo en el nivel de glucosa en la sangre. Además, la tagatosa es un edulcorante bajo en calorías que tiene aproximadamente el 30% de las calorías de sacarosa. Además, la tagatosa tiene un efecto prebiótico que promueve el crecimiento de bacterias ácido lácticas benéficas a través de la fermentación por la microflora intestinal.

15

20

Sólo alrededor del 20% de la tagatosa ingerida se absorbe en el intestino delgado y la fracción restante el 80% de la tagatosa alcanza el intestino grueso donde vive la microflora intestinal, y promueve selectivamente la producción de bacterias ácido lácticas, produciendo así ácidos grasos de cadena corta. Particularmente, la tagatosa tiene una propiedad prebiótica capaz de producir grandes cantidades de butirato (hasta un 50% del total de los ácidos grasos de cadena corta) que puede prevenir el cáncer de colon. Además, la tagatosa es un azúcar natural que tiene un valor de bajo contenido calórico de 1,5 kcal/g y ha obtenido un estatus de GRAS (Generalmente reconocido como seguro) bajo la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), permitiendo así el uso como un edulcorante funcional en alimentos, bebidas, alimentos saludables, aditivos de dieta y similares.

25

30

Sin embargo, la tagatosa no a menudo se encuentra en la naturaleza y es un azúcar raro presente sólo en pequeñas cantidades en productos lácteos y algunas plantas. Con el fin de usar la tagatosa como un edulcorante funcional y bajo en calorías, es esencial desarrollar un procedimiento para la producción masiva de tagatosa desde materias primas baratas.

35

La tagatosa se ha producido convencionalmente mediante la isomerización de galactosa. Con el fin de producir de forma económica la galactosa, se han realizado estudios para desarrollar diferentes materias primas que contienen galactosa, procedimientos para obtener galactosa y procedimientos para producir tagatosa usando las materias primas. Se ha utilizado la lactosa como la materia prima más representativa para la tagatosa. Sin embargo, los precios de la lactosa o los productos que contienen lactosa muestran un patrón de precio único de disminución y aumento repetitivo debido a diversos factores tales como las cantidades de leche natural producida de acuerdo al clima, la demanda de leche en polvo, los cambios en la cantidad de lactosa consumida en países en desarrollo y similares. Dichas fluctuaciones de precio en el mercado de la leche natural hacen difícil el suministro estable de materias primas para la producción de tagatosa. En consecuencia, hay una necesidad de un nuevo procedimiento para la producción de tagatosa utilizando materias primas comunes (glucosa, sacarosa, fructosa y similares).

40

45

La Publicación de Patente coreana no examinada No. 10-2009-0125004 divulga un procedimiento para producir galactosa mediante epimerización de glucosa. La Publicación de Patente coreana no examinada No. 10-2006-0125971 divulga epimerización en C3 de la cetohexosa. Sin embargo, ambos documentos fallan al divulgar un procedimiento para la producción de tagatosa a través de epimerización en C4 de la fructosa.

50

DivulgaciónProblema técnico

55

En el pasado, la tagatosa fue producida a partir de galactosa descompuesta a partir de lactosa o productos que contienen lactosa y diversos otros recursos biológicos que contienen galactosa. Sin embargo, hasta ahora, las materias primas evaluadas como capaces de ser comercialmente producidas o acercarse a la comercialización en términos de suministro estable de materias primas y eficiencia de la inversión son la lactosa o productos que contienen lactosa (suero de leche etc.). Sin embargo, la lactosa o productos que contienen lactosa se someten a variaciones de precios extremos y tienen un problema que no se asegura el suministro estable de tagatosa debido al reciente aumento en el consumo de lactosa y aumento del precio.

60

Además, un procedimiento químico convencional para convertir la lactosa en galactosa tiene un límite en la epimerización y un procedimiento enzimático convencional también tiene un límite debido al uso de galactosa.

65

Por consiguiente, es un aspecto de la presente invención para proporcionar un procedimiento para producir tagatosa, que es más estable y económico mientras que garantizan una mayor eficiencia en la producción que un procedimiento típico para producir tagatosa.

5 Solución Técnica

Las realizaciones de la presente invención proporcionan un procedimiento para producir tagatosa, incluyendo: realizar la epimerización de fructosa utilizando hexuronato C4-epimerasa para obtener un producto epimerizado incluyendo tagatosa; purificar el producto epimerizado; y cristalizar el producto epimerizado purificado.

10

Efectos Ventajosos

La presente invención puede proporcionar un procedimiento para producir tagatosa que es económica y tiene alto rendimiento utilizando una materia prima común, fructosa, en lugar de lactosa con fluctuaciones violentas del precio, reduciendo así los costos de producción.

15

En general, ya que es bien sabido en la materia que la fructosa puede ser producida industrialmente a partir de la glucosa o sacarosa, las materias primas sugeridas en la presente invención abarcan no sólo la fructosa sino también las materias primas que contienen parcial o totalmente fructosa de manera que se pueda asegurar una producción más económica. A saber, la presente invención abarca la producción de tagatosa a través de una conversión enzimática de almidón, azúcar cruda o sacarosa.

20

Además, la presente invención puede producir tagatosa a partir de la fructosa, lo que asegura una producción masiva eficiente de tagatosa, atrayendo la atención como materiales alimentarios importantes.

25

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo de un proceso para producir tagatosa de acuerdo con una realización de la presente invención.

30

Las Figuras 2 a 5 muestran diagramas de flujo de procesos para producir tagatosa de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La Figura 6 es una gráfica de una HPLC que representa la producción de tagatosa a través de la epimerización en C4 utilizando fructosa como un sustrato.

35

La Figura 7 es una gráfica que representa la actividad de C4-epimerasa que depende en la temperatura de reacción.

La Figura 8 es una gráfica que representa la actividad de C4-epimerasa dependiendo del pH.

La Figura 9 es una gráfica que representa la actividad de C4-epimerasa que depende en el tipo de sal metálica.

40

La Figura 10 es una gráfica que representa una tasa de conversión a partir de fructosa a tagatosa que depende en la concentración de fructosa como un sustrato.

La Figura 11 muestra gráficas que representan una relación entre una tasa de conversión y un rendimiento de recuperación para la fructosa y tagatosa.

Mejor Modo

45

A continuación, se describirá con más detalle la presente invención. Las descripciones de los detalles evidentes para los expertos en la materia que tienen conocimiento medio en este campo técnico o campo relevante serán omitidas en el presente.

50

Como se utiliza en el presente documento, el término "C_n" se refiere a una posición de carbono determinada de acuerdo con la numeración de carbono prescrita por la nomenclatura IUPAC en donde n es un entero de 1 o más. Por ejemplo, "epimerización en la posición de carbono 4" está representado por "epimerización en C4".

55

De acuerdo con una realización de la presente invención, un procedimiento para producir tagatosa incluye: a) realizar la epimerización de fructosa utilizando hexuronato C4-epimerasa para obtener un producto epimerizado incluyendo tagatosa; b) purificar el producto epimerizado; y c) cristalizar el producto epimerizado purificado.

60

En general, los monosacáridos pueden ser clasificados como aldohexosas y cetohehexosas. Aldohexosa se refiere a una aldosa que tiene seis átomos de carbono y un grupo aldehído en un extremo de la misma. Ejemplos de aldohexosa incluyen glucosa, galactosa, alosa, gulosa, altrosa, manosa, talosa e idosa, sin limitarse a las mismas. Además, una cetohehexosa como se utiliza en el presente documento se refiere a un monosacárido que tiene seis átomos de carbono y un grupo cetona. Ejemplos de cetohehexosa incluyen fructosa, tagatosa, psicosa y sorbosa, sin limitarse a las mismas. Preferiblemente, la fructosa se utiliza como una cetohehexosa. Como se utiliza en este documento, tanto la fructosa como la tagatosa se refieren a D-fructosa y D-tagatosa, a menos que se especifique lo contrario.

65

De acuerdo a otra realización de la presente invención, la fructosa se obtiene a partir de sacarosa o glucosa. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para producir tagatosa con alto rendimiento utilizando materias primas baratas y comunes tales como glucosa, fructosa, sacarosa o similares, permitiendo así la producción masiva de tagatosa.

Por consiguiente, el procedimiento además puede incluir, antes de la etapa a), realizar la hidrólisis de la sacarosa para obtener fructosa. Las enzimas utilizadas en la hidrólisis pueden incluir al menos una seleccionada del grupo que consiste de β -D-fructosidasas, tales como β -fructofuranosidasa, invertasa y sacarasa; sucrasa, α -glucosidasa y α -D-glucohidrolasa, sin estar limitado a las mismas.

Adicionalmente, el procedimiento además puede incluir, antes de la etapa a), realizar la isomerización de la glucosa para obtener fructosa. Las enzimas utilizadas en la isomerización (isomerasas) pueden incluir glucosa isomerasa o fosfoglucoisomerasa, sin limitarse a las mismas.

El hexuronato de C4-epimerasa de acuerdo a la presente invención puede incluir *Thermotoga sp.* derivada de enzimas o variantes de las mismas. Específicamente, la hexuronato C4-epimerasa puede incluir *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, o *Thermotoga thermarum* derivados de enzimas o variantes de los mismos.

Además, la hexuronato C4-epimerasa puede obtenerse, por ejemplo, transformando una cepa (microorganismo) tal como *Escherichia coli* (*E. coli*) y similar con ADN genómico representado por las SEQ ID NO: 1 a 3, cultivar la cepa transformada para obtener una célula cultivada, interrumpir la célula cultivada y purificar el extracto de la célula a través de una columna y similares. Las cepas para la transformación pueden incluir *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Aspergillus oryzae*, o *Bacillus subtilis*, y similares. Ejemplos de las cepas transformadas de *E. coli* incluyen *E. coli* BL21(DE3)pET21a-TM (número de acceso: KCCM11542P), *E. coli* BL21(DE3) pET21a-TN (número de acceso: KCCM11543P), o cepa *E. coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) (número de acceso: KCCM11544P) y similares. Las cepas *E. coli* BL21(DE3)pET21a-TM, *E. coli* BL21(DE3) pET21a-TN y *E. coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) fueron depositadas en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) (361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), que es un depósito internacional, el 23 de mayo de 2014 como números de acceso KCCM11542P, KCCM11543P y KCCM11544P, respectivamente.

Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención se relaciona a cada cepa depositada de *E. coli* BL21(DE3)pET21a-TM (número de acceso: KCCM11542P), *E. coli* BL21(DE3) pET21a-TN (número de acceso: KCCM11543P), o *E. coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) (número de acceso: KCCM11544P).

La epimerización de la fructosa usando hexuronato C4-epimerasa se puede llevar a cabo de 60 °C a 90 °C y un pH de 5 a 8, preferiblemente en un pH de 6 a 8 y temperatura alta tal como 70 °C a 90 °C o 75 °C a 90 °C. Dentro de este intervalo, la reacción enzimática se puede llevar a cabo a una temperatura relativamente alta, minimizando así la contaminación de microorganismos en el proceso, proporcionando así efectos para mejorar la solubilidad de cetohechosas utilizadas como substratos mientras maximizan una tasa de reacción y una tasa de conversión de enzimas. El efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática se describe con referencia a la Figura 7. Mientras la temperatura aumenta, la actividad de C4-epimerasa también aumenta. Sin embargo, en alrededor 90 °C, la actividad enzimática puede ser rápidamente disminuida.

Además, el efecto del pH en la actividad enzimática se describe con referencia a la Figura 8. A medida que aumenta el pH, la actividad de C4-epimerasa tiende a aumentar. Un intervalo de pH apropiado puede ser dependiente en tampones utilizados en la reacción enzimática. Por ejemplo, un pH adecuado para el tampón fosfato puede variar entre pH 5 y pH 9, y un pH apropiado para tampón Tris puede variar entre pH 8,0 a pH 8,5. Teniendo en cuenta los procesos posteriores, un pH de 8 o menos es adecuado.

En una realización, la epimerización utilizando el C4-epimerasa se puede llevar a cabo en presencia de una sal metálica. La sal metálica puede actuar como un catalizador en la epimerización. Ejemplos de la sal metálica puede incluir NiSO₄, NiCl₂, CoCl₂, MnCl₂ o ZnSO₄. Específicamente, al menos se puede usar uno de NiSO₄, NiCl₂ o CoCl₂. Haciendo referencia a la Figura 9, la actividad de C4-epimerasa puede variar dependiendo del tipo de sal metálica. En este caso, NiSO₄, NiCl₂, CoCl₂, MnCl₂ y ZnSO₄ se refieren en orden descendente de la actividad de C4-epimerasa. La concentración de la sal metálica puede variar desde 0,001 mM a 50 mM. Específicamente, la concentración de la sal metálica puede variar desde 0,01 mM a 25 mM.

El producto epimerizado puede incluir tagatosa en una cantidad de 0,05% en peso (% en peso) o más, por ejemplo, 0,07% en peso o más, específicamente, 0,1% en peso o más. La tasa de conversión de la tagatosa puede ser 5% o más, por ejemplo, 7% o más.

En la presente invención, se puede utilizar cualquiera de los procedimientos de purificación conocidos en la materia. Ejemplos del procedimiento de purificación pueden incluir purificación iónica y cromatografía o cristalización, sin limitarse a las mismas. La separación de los azúcares mediante un procedimiento cromatográfico se puede llevar a cabo en base a la diferencia en fuerzas de unión débiles entre azúcares para

estar separados e iones metálicos unidos a las resinas iónicas. En una realización, las resinas iónicas pueden ser resinas de intercambio catiónico de ácido fuerte a las que se le pueden unir un residuo de K, Na, Ca o Mg.

5 En el caso donde los azúcares están separados son cetohexosas tal como fructosa y tagatosa, resinas separadas que tienen residuos tales como K, Na, y similares se utiliza debido a la similitud estructural. Esto significa que la tagatosa pura puede ser separada solamente cuando dos procedimientos cromatográficos separados se realizan en secuencia. Ejemplos de residuos de ion metálico utilizados en separación cromatográfica puede incluir K, Na, Ca y Mg, sin limitarse a los mismos.

10 La cromatografía es específicamente cromatografía SMB (Lecho Móvil Simulado).

15 En una realización, se puede realizar además antes o después de la purificación, decoloración, desalación o ambos decoloración y desalación. Específicamente, se puede realizar antes de la purificación, decoloración, desalación o ambos decoloración y desalación. La decoloración puede incluir agregar carbón activado con agitación en una cantidad de 0,05% en peso a 5,0% en peso en el producto epimerizado. Se puede realizar la agitación en una velocidad de agitación de 10 ppm a 1000 rpm, específicamente 10 ppm a 100 ppm durante 30 minutos a 3 horas.

20 Se puede realizar la desalación utilizando una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico o ambas la resina de intercambio aniónico y catiónico. A través de los procesos de purificación fónica y decoloración, es posible eliminar las impurezas tales como materiales de coloración y materiales iónicos en el producto epimerizado.

25 La resina de intercambio catiónico es un polímero que tiene grupos ácidos y es capaz de intercambiar cationes tales como iones de hidrógeno o iones metálicos. La resina de intercambio aniónico es un polímero que tiene grupos básicos y es capaz de intercambiar grupos de amonio con aniones tales como iones de hidroxilo o iones de haluro. En la presente invención, se puede utilizar al menos una de las resinas de intercambio catiónico y las resinas de intercambio aniónico. Las resinas de intercambio catiónico y las resinas de intercambio aniónico se pueden utilizar simultáneamente con el fin de eliminar de manera efectiva los materiales fónicos. En este caso, la proporción de las resinas de intercambio catiónico a las resinas de intercambio aniónico puede ser 1:1 a 1:3, específicamente 1:1,5 a 1:2. Después de la purificación del ion, el contenido de materiales iónicos en el producto epimerizado puede ser 10 microsiemens o menos por centímetro unitario en la medición utilizando un sistema de conducción eléctrica.

35 El producto epimerizado que ha pasado a través de procesos de purificación, decoloración y/o desalación de manera que la tagatosa se separa y se eliminan las impurezas tales como materiales coloración y materiales iónicos se concentra además para ser utilizada en una reacción posterior. Por ejemplo, el producto epimerizado puede concentrarse para tener una concentración de tagatosa de 40 Bx o más o 50 Bx o más.

40 El producto epimerizado puede ser cristalizado enfriando lentamente el producto epimerizado. Se puede realizar la cristalización enfriando el producto epimerizado desde 40 °C a 90 °C a una tasa de 0,1 °C a 5 °C por hora. Los cristales de tagatosa obtenidos pueden ser sometidos a deshidratación y secado.

45 Haciendo referencia a la Figura 2, un procedimiento para producir tagatosa incluye realizar la epimerización de la fructosa utilizando hexuronato C4-epimerasa para obtener un producto epimerizado incluyendo tagatosa; purificando el producto epimerizado; concentrando el producto epimerizado purificado; cristalizando el producto epimerizado concentrado para obtener cristales de tagatosa; y después deshidratar y secar los cristales de tagatosa.

50 La tagatosa producida por el procedimiento de producción de acuerdo a una realización puede tener una pureza de 80% o más, por ejemplo, 90% o más, específicamente 95% o más, más específicamente 98% o más. La pureza se puede medir después de la etapa b) y antes de la etapa c). En una realización adicional, la pureza se puede medir después de la etapa c).

55 De acuerdo con una realización adicional de la invención, la fructosa sin reaccionar después de la etapa b) se puede reciclar en la etapa a), o el alimento del cual los cristales son separados después de la etapa c) se puede reciclar en la etapa b), o se pueden realizar ambos procesos.

60 Haciendo referencia a la Figura 4, la tagatosa y fructosa en el producto epimerizado son separadas a través de la etapa de purificación, y la fructosa separada puede ser reutilizada como un sustrato para la epimerización en la etapa a). Además, haciendo referencia a la Figura 3, la tagatosa en forma de cristal y el alimento desde el cual los cristales son eliminados se separan en la etapa de cristalización. El alimento puede incluir una cierta cantidad de tagatosa, que es reutilizada en la etapa de purificación. La Figura 5 representa una realización de la presente invención en donde la reutilización de la fructosa separada en la etapa a) y la reutilización del alimento desde el cual se eliminan los cristales en la etapa b) son realizados al mismo tiempo.

65

La solución de azúcar obtenida a partir de la hidrólisis de la sacarosa, isomerización de la glucosa y/o hexuronato epimerización en C4 de acuerdo con una realización de la invención puede ser una solución de azúcar mezclada que contiene al menos una seleccionada del grupo que consiste de sacarosa, glucosa, fructosa y tagatosa. La solución del azúcar se puede separar usando un procedimiento de separación cromatográfica.

5 En general, el azúcar mezclado compuesto de aldohexosa y la cetohehexosa puede ser separada de forma económica mediante la cromatografía utilizando una resina que tiene residuos de catión. Sin embargo, cuando el azúcar mezclado compuesto del mismo tipo de azúcar, se utiliza una resina para la separación que tiene residuos tales como K y Na debido a la similitud estructural. Esto significa que se puede obtener tagatosa pura
10 sólo mediante la realización secuencial de dos procesos de cromatografía diferentes. Ejemplos de residuos de ión metálico útiles en separación cromatográfica puede incluir K, Na, Ca y Mg, sin limitarse a los mismos.

La cromatografía es preferiblemente cromatografía SMB (Lecho Móvil Simulado). Los reactivos sin reaccionar en la etapa de separación cromatográfica pueden ser opcionalmente reciclados dependiendo del tipo de solución del
15 azúcar como a continuación.

Cuando la solución del azúcar contiene tagatosa como un componente principal (90% o más), la tagatosa puede ser concentrada y cristalizada, según sea necesario.

20 Cuando la solución del azúcar contiene fructosa como un componente principal, la solución del azúcar puede ser concentrada y reciclada a una etapa anterior a la etapa de epimerización.

Cuando la solución del azúcar contiene glucosa como un componente principal, la solución del azúcar puede ser concentrada y reciclada a una etapa anterior a la etapa de isomerización.

25 Cuando la solución del azúcar contiene sacarosa como un componente principal, la solución del azúcar puede ser concentrada o cristalizada y luego procesada, la cual se utiliza como una solución de sacarosa o como otras materias primas.

30 **Modo de la Invención**

A continuación, la presente invención se describirá en mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de la presente invención.

35 **Ejemplo 1**

Evaluación de las características de separación cromatográfica de acuerdo a la tasa de conversión de la enzima

40 Con el fin de separar y cristalizar un material objetivo (tagatosa) con una alta pureza desde un azúcar mezclado (fructosa y tagatosa), la purificación utilizando la separación cromatográfica es muy importante. En general, la purificación de la solución del azúcar para obtener los productos cristalizados logra diferentes rendimientos de recuperación (%), dependiendo del contenido del material objetivo (tagatosa). Se obtiene un rendimiento de alta
45 recuperación (%) en proporción con el aumento en el contenido del material objetivo. Como resultado, es posible producir un producto final con relativamente un bajo costo de proceso y producción. Con el fin de producir de manera efectiva cristales de azúcar (alta pureza, alto rendimiento), es muy importante asegurar que el material objetivo (tagatosa) contenido en el alimento tiene una pureza de 90% o más, más preferiblemente 95%.

50 Las condiciones operativas para la cromatografía pueden provocar resultados distintos dependiendo del contenido de alimento, el tipo de la resina de separación, la pureza o rendimiento deseado de un material objetivo (tagatosa) en el líquido separado. Por consiguiente, el contenido de alimento de la solución de reacción obtenida a través del proceso de conversión enzimático para convertir fructosa en tagatosa, es decir la tasa de conversión (%) de fructosa o tagatosa, afecta el rendimiento de la cromatografía. Cuando la pureza de la tagatosa en el líquido separado se fijó a 95%, el cual fue preferido en el proceso de cristalización, se observaron
55 cambios en el rendimiento (%) de separación cromatográfica dependiendo del contenido de alimento (%) de la fructosa y tagatosa en el alimento.

60 Con el fin de maximizar la eficiencia de la separación cromatográfica de azúcares, se obtuvieron resultados parcialmente mejorados cambiando el tamaño de las resinas usadas en la separación cromatográfica, el tipo de residuo de ion metálico modificado (por ejemplo, K, Na, Ca, Mg y similares). Sin embargo, en la presente invención, una resina de separación que ha modificado los residuos de Ca se utilizó en consideración de las características de separación general de la fructosa y tagatosa. La tabla 1 muestra las condiciones para la evaluación.

65

TABLA 1

Muestra	Muestra de monosacárido mezclado que consiste de fructosa y tagatosa
Concentración de la muestra suministrada	Bx 60%
Adsorbente	Amberlite (Amberlite CR-1310; tipo Ca)
Tamaño de columna	20 mm x 1000 mm (314 ml)
Desorbente	H ₂ O
Volumen suministrado	15 ml
Caudal	26 ml/min (LV 5 m/h)
Temperatura	60°C

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, los resultados de la prueba de separación cromatográfica SMB dependiendo del contenido de alimento (%) de la fructosa y la tagatosa se muestran en la siguiente Tabla. Cuando la pureza de la tagatosa en el líquido separado se fijó a 95%, el cual fue preferido en el proceso de cristalización, se observó el rendimiento de recuperación de la tagatosa y fructosa dependiendo en el contenido de alimento de la fructosa y tagatosa. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Resultados del análisis de las características de separación cromatográfica en función del contenido de alimento de fructosa y tagatosa								
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7
Contenido de alimento (%)	Tagatosa	5	10	15	20	25	30	35
	Fructosa	95	90	85	80	75	70	65
Rendimiento de recuperación (%)	Tagatosa	82,14	86,15	90,98	92,16	94,13	94,45	95,48
	Fructosa	99,99	99,56	99,44	99,02	98,49	98,12	97,53
Pureza de la tagatosa (%)		95,46	95,76	95,85	95,63	95,39	95,48	95,62

Haciendo referencia a la Tabla 2 y la Figura 11, se puede ver que el rendimiento de recuperación (%) de la tagatosa es especialmente afectivo a la tasa de conversión de la enzima (%) en comparación con la fructosa. Con el fin de producir tagatosa en un rendimiento de recuperación del 90% o más y una pureza del 95%, el título de la enzima y las condiciones del proceso debe ser establecido de manera que la tasa de conversión de la enzima (%) del 15% o más se puede obtener. Asimismo, con el fin de producir tagatosa en un rendimiento de recuperación del 85% o más y una pureza del 95%, la tasa de conversión de la enzima (%) del 10% o más debería ser asegurado. Por lo tanto, se puede confirmar que la tasa de conversión de la enzima (%) es un factor muy importante en términos de eficiencia del proceso de producción de acuerdo a la presente invención.

Ejemplo 2

Preparación de la cetohexosa C4-epimerasa

Se realizaron reacciones en cadena de un polímero (PCR) utilizando, como un modelo, un ADN genómico (SEQ ID NO: 1) de *Thermotoga maritima* (cepa ATCC 43589 /MSB8/DSM 3109/JCM 10099), un microorganismo resistente al calor, y agregar un cebador directo (5'-GGGCATATGATGGTCTTGAAAGTGTTCAAAG-3'), SEQ ID NO: 5, y un cebador inverso (5'-AAACTCGAGCCCCTCCAGCAGATCCACGTG-3'), SEQ ID NO: 6.

Además, se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) usando como modelo, un ADN genómico (SEQ ID NO: 2) de *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359), un microorganismo resistente al calor, y agregar un cebador directo (5'-GGGCATATGATGGTCTTGAAAGTGTTCAAAG-3'), SEQ ID NO: 5, y un cebador inverso (5'-AAACTCGAGTCACCCCTTCAACAGGTCTACGTG-3'), SEQ ID NO: 7.

Las condiciones para las PCR se muestran en las Tablas 3 y 4. Los genes amplificados por PCR fueron insertados en un vector pET-21a, seguido por la transformación en la cepa *E. coli* DH5α. De la cepa transformada, se aislaron los plásmidos, que fueron secuenciados para identificar las secuencias base de los genes insertados. Los plásmidos se transformaron en una cepa de expresión de la proteína, *E. coli* BL21(DE3), que se utilizó en la producción de cetohexosa C4-epimerasa. Con el fin de producir cetohexosa C4-epimerasa, *E. coli* BL21(DE3)pET21a-TM (incluyendo un gen de expresión de la enzima derivada de *Thermotoga maritima*) y *E.*

coli BL21(DE3)pET21a-TN (incluyendo un gen de expresión de la enzima derivada de *Thermotoga neapolitana*) fueron cultivados en un medio LB incluyendo 100 µg/ml de ampicilina por alrededor de 2 horas, en el que la temperatura de cultivo era de 37 °C y la velocidad de agitación fue de 180 rpm. Después del cultivo, se midió la densidad óptica de los microorganismos a 600 nm. Si el valor de densidad óptica cae dentro de 0,4 a 0,8, se agregó 0,25 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), seguido por el cultivo durante la noche bajo las mismas condiciones para inducir la expresión de la proteína.

TABLA 3

Composición de la solución de reacción	Cantidad agregada (ml)
Tampón PCR (5X)	10
dNTP (2,5 mM cada una)	1
Modelo PCR (ADNg de <i>T. maritime</i>)	1
Cebador directo (100 pmol)	1
Cebador inverso (100 pmol)	1
ADN Polimerasa (Phusion, NEB Co. Ltd.)	0,5
Agua destilada esterilizada	35,5

TABLA 4

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclo
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	35
Recocido	65,7	30	
Extensión	72	50	
Extensión final	72	350	1

Ejemplo 3

Purificación de la cetohexosa C4-epimerasa

Con el fin de medir la actividad de la cetohexosa C4-epimerasa expresada en el microorganismo, se realizó la purificación de proteína por el siguiente procedimiento. Una solución de cultivo en la que la expresión de proteína se completó se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos para recolectar las células cultivadas, que nuevamente se suspendieron en un tampón de 50 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) incluyendo 10 mM de imidazol y 300 mM de NaCl. Las células suspendidas fueron interrumpidas por un sonicador y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos para cosechar un sobrenadante. El sobrenadante cosechado se hizo fluir a través de una columna empacada con una resina Ni-NTA. A esto, se hizo fluir a través un tampón de 50 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) incluyendo 20 mM de imidazol y 300 mM de NaCl en una cantidad 10 veces el volumen de la resina en la columna, eliminando así proteínas unidas no específicamente a la resina. Finalmente, se hizo fluir a través un tampón de 50 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) incluyendo 250 mM de imidazol y 300 mM de NaCl para eludir y purificar una cetohexosa C4-epimerasa. Con el fin de eliminar el imidazol en la enzima purificada, se hizo fluir a través un tampón de 50 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) varias veces de manera que la concentración de imidazol fue 0,01 mM o menos. La enzima purificada fue cuantificada por el ensayo de Bradford.

Ejemplo 4

Conversión de fructosa en tagatosa

Con el fin de medir la actividad de las enzimas obtenidas en los Ejemplos 2 y 3, la enzima purificada se agregó a 1% en peso de fructosa, 0,01 mM de ZnSO₄, y 50 mM de tampón fosfato (pH 7,0), seguido de una reacción en una temperatura de reacción de 60 °C durante 3 horas. La concentración de tagatosa convertida por cetohexosa C4-epimerasa y la tasa de conversión de fructosa a tagatosa se muestran en la Tabla 5.

Además, después de la reacción, la fructosa y la tagatosa restantes como productos fueron cuantificados por HPLC, en el que la columna fue una Shodex Sugar SP0810, la temperatura de la columna era de 80 °C y agua como fase móvil se hizo fluir a través de una velocidad de 0,5 ml/min. La Figura 6 representa los resultados de la reacción de la enzima utilizando fructosa como un sustrato mediante la detección y cuantificación de los máximos por HPLC.

TABLA 5

	Concentración de tagatosa (%)	Tasa de conversión (%)
<i>T. maritima</i>	0,093	9,3
<i>T. neapolitana</i>	0,080	8,0

Haciendo referencia a la Tabla 5 y la Figura 6, se identificó que los máximos para la fructosa y tagatosa no fueron observados cuando se realizó la conversión sólo añadiendo enzimas al tampón fosfato sin añadir fructosa (representada por una línea discontinua).

Sin embargo, cuando se agrega la fructosa y las enzimas con el fin de realizar la epimerización (representado por una línea sólida), sólo se observó el máximo para la fructosa antes de los 30 minutos después del inicio de la reacción de enzima. Según pasa el tiempo, se observaron los máximos para tagatosa después de alrededor de 30 minutos desde el inicio de la reacción enzimática.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 5 y Figura 6, se confirmó que la fructosa podría convertirse en tagatosa usando las enzimas preparadas en los Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 5

Construcción de biblioteca de mutante y selección de mutantes mejorados

Un gen derivado de *T. neapolitana* fue utilizado como un modelo para realizar una mutación aleatoria. Específicamente, la *T. neapolitana* fue sometida a mutagénesis aleatoria utilizando un Kit de Mutagénesis aleatoria diversificada (fabricado por ClonTech Co., Ltd.). El gen resultante se amplificó a través de PCR bajo las condiciones indicadas en las siguientes Tablas 6 y 7. El gen amplificado fue insertado en un vector pET-28a para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Las etapas restantes se realizaron de la misma manera como en el Ejemplo 2.

TABLA 6

Composición de la solución de reacción	Cantidad agregada (ml)
Agua de Calidad PCR	36
Tampón 10X Taq TITANIO	5
MnSO ₄ (8 mM)	4
dGTP (2 mM)	1
Mezcla dNTP 50X Diversificada	1
Mezcla cebador	1
ADN modelo	1
Polimerasa Taq TITANIO	1

TABLA 7

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclo
Desnaturalización inicial	94	30	1
Desnaturalización	94	30	25
Recocido / Extensión	68	60	
Extensión final	68	60	1

Se seleccionó un mutante candidato de alta actividad de las bibliotecas de mutantes obtenidas a través de mutagénesis aleatoria y porciones mutadas en la secuencia base de los mutantes que fueron identificados por la secuenciación de ADN. Se encontró que el mutante tiene un total de 5 posiciones mutadas en la secuencia de aminoácidos (S125D/V163A/D186N/F263I/D311G).

El mutante tiene una secuencia base del ADN genómico representada en SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos que codifica la enzima producida por el mutante fue como se estableció en SEQ ID NO: 4. El mutante que produce cetohexosa C4-epimerasa es *E. coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) (número de acceso: KCCM11544P). El mutante fue utilizado para producir C4-epimerasa de la misma manera como en los Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 6

Evaluación de la tasa de conversión de la fructosa a tagatosa utilizando mutantes mejorados

5 Usando la enzima derivada del mutante mejorado, las velocidades de conversión dependiendo en la temperatura, pH, y sal metálica fueron evaluadas por el siguiente procedimiento.

(1) Evaluación de comparación de la actividad enzimática dependiendo de la temperatura de reacción

10 Con el fin de identificar un cambio en la actividad enzimática dependiendo de la temperatura de reacción, la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 se añadió a 10% en peso de fructosa, 0,3 mM de ZnSO₄ y 50 mM de tampón fosfato (pH 7,0) y después reaccionó durante 3 horas. Como se muestra en la Figura 7, la actividad enzimática se midió en diferentes temperaturas de reacción de 37 °C a 96 °C.

15 La actividad enzimática mostró una tendencia de aumento con el aumento de temperatura. Sin embargo, la actividad enzimática disminuyó a una temperatura de reacción de 90 °C o más.

(2) Evaluación de comparación de la actividad enzimática dependiendo en el pH de reacción

20 Con el fin de identificar un cambio en la actividad enzimática dependiendo en el pH de reacción, la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 se añadió a 10% en peso de fructosa, 0,01 mM de NiSO₄, un tampón fosfato o tampón Tris y reaccionó durante 3 horas. Específicamente, se utilizó un tampón fosfato potásico en un pH de 5 a 8,0 y se utilizó un tampón Tris en un pH 8,0 a pH 8,5. Como se muestra en la Figura 8, se midió la actividad enzimática en diferente pH de reacción. Cuando se utilizó el tampón fosfato potásico y después se utilizó el
25 tampón Tris, la actividad enzimática mostró una tendencia de aumento con el aumento de pH. En el mismo pH, se observó una disminución de la actividad enzimática cuando se utilizó el tampón Tris.

(3) Evaluación de comparación de la actividad enzimática dependiendo del tipo de sal metálica

30 Con el fin de identificar un cambio en la actividad enzimática dependiendo del tipo de sal metálica, la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 se añadió a 10% en peso de fructosa, y 50 mM de tampón fosfato y reaccionó durante 3 horas. En esta reacción, se utilizó 1 mM de 13 diferentes sales metálicas. Como resultado, las sales metálicas mostraron diferente actividad enzimática en el orden de NiSO₄ > NiCl₂ > CoCl₂ > MnCl₂ = ZnSO₄ sobre el listado de sales metálicas en orden descendente de actividad (ver Figura 9).

35

(4) Evaluación de la tasa de conversión por reacción enzimática

40 Con el fin de identificar un cambio en la actividad enzimática dependiendo en la concentración de sustrato, la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 se añadió a 10% en peso de fructosa, 0,3mM de NiSO₄, y 50mM de tampón fosfato, y después reaccionó a 60 °C durante 3 horas. Con el fin de evaluar la tasa de conversión, la reacción enzimática se realizó durante 18 horas. Haciendo referencia a la Figura 10, se puede observar que la tasa de conversión de fructosa a tagatosa fue del 30% cuando se utilizó el mutante de enzima mejorado.

Ejemplo 7

45

Separación cromatográfica de fructosa y tagatosa

50 La enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 se añadió a 10% en peso de fructosa, 0,01 mM de NiSO₄, y 50mM de tampón fosfato, y después reaccionó a 60 °C durante 3 horas. La solución mezclada de tagatosa obtenida se añadió a 0,1 a 0,5% (p/v) del polvo de carbón activado, seguido por agitación a 10 rpm a 100 rpm durante 0,5 horas a 1 hora, filtrado por un filtro prensa para eliminar los materiales de color, obteniendo así una solución mezclada de fructosa y tagatosa.

55 Con el fin de separar con eficacia la fructosa y tagatosa de la solución mezclada de fructosa y tagatosa mediante cromatografía, la solución mezclada se hizo fluir a través de columnas llenas con una resina de intercambio catiónico sustituida con grupos hidrógeno y una resina de intercambio aniónico sustituida con grupos hidroxilo, retirando así componentes de ion en la solución.

60 Por los procesos de desalación y decoloración mencionados anteriormente, se obtuvo una solución mezclada de tagatosa producida a partir de fructosa, de la cual se eliminaron las impurezas tales como materiales con color y componentes de ion. La solución mezclada se concentró al 60% (g/g de solución) y después de sometió a una cromatografía fraccionada utilizando un Sistema de Lecho Móvil Simulado Avanzado (fabricado por Organo en Japón) empacada con una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte sustituida con grupos de calcio (Amberlite CR1310 Ca), midiendo así la pureza de los componentes, el rendimiento de recuperación y una
65 proporción entre un alimento mezclado de tagatosa convertido de fructosa y agua como una fase móvil

(proporción de volumen de desorción/alimento).

TABLA 8

Condición	Resultado
Proporción de alimento mezclado de tagatosa convertida a partir de fructosa (%)	fructosa 75,4%, tagatosa 24,6%
Proporción de volumen de Desorbente/Alimento	2,96
Pureza de la tagatosa (%)	99,1
Rendimiento de recuperación de la tagatosa (%)	94,4
Pureza de la fructosa (%)	92,9
Rendimiento de recuperación de la fructosa (%)	99,6

Ejemplo 8

Cristalización de tagatosa

La solución recolectada a partir de la separación cromatográfica del Ejemplo 7 se sometió a cristalización. Se realizó la cristalización se realizó concentrado en calor la solución bajo vacío de manera que la concentración de tagatosa se volvió 70 Bx, seguido de un enfriamiento lento de 60 °C a 30 °C a una tasa de 0,7 °C a 1 °C por hora.

Después de la cristalización, los cristales resultantes fueron sometidos a deshidratación centrífuga para cosechar cristales. Los cristales se secaron a 60 °C utilizando un secador de lecho fluidizado durante 1 hora para medir la pureza y rendimiento de recuperación de los cristales.

TABLA 9

Resumen de los resultados principales	
Condición	Resultado
Pureza de los cristales de tagatosa (%)	99,9
Rendimiento de recuperación de los cristales de tagatosa (%)	40,2

Ejemplo 9

Diseño de proceso de reciclaje continuo

Un proceso de producción de reciclaje continuo de tagatosa utilizando la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 5 fue diseñado de la siguiente manera.

El proceso de producción de reciclaje continuo se muestra brevemente en las Figuras 2, 3, 4, y 5. En la etapa de la purificación, los procesos para mejorar la calidad del producto tal como la decoloración, y la desalación se pueden realizar opcionalmente cuando sea necesario.

El proceso de producción de reciclaje continuo incluye pasar una solución que contiene fructosa como componente principal a través de un reactor de hexuronato C4-epimerasa para producir tagatosa; someter el producto de epimerización compuesto de un azúcar mezclada de fructosa y tagatosa para la separación cromatográfica; opcionalmente, realizar una etapa de concentración dependiendo de la concentración de tagatosa en el producto epimerizado purificado; concentrar la solución de separación cromatográfica que contiene la tagatosa como componente principal (90% o más); y si es necesario, realizar la cristalización para producir tagatosa. El líquido cromatográfico restante que contiene fructosa como un componente principal fue reciclado a la etapa anterior al reactor de epimerización y/o el alimento no cristalizado obtenido en la cristalización de tagatosa se recicló a la etapa posterior a la epimerización.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION
- <120> Procedimiento de producción de tagatosa
- <130> P14-5047
- <150> KR 2013/065,002

ES 2 751 691 T3

<151> 2013-06-05

<150> KR 2014/067867

<151> 2014-06-03

5

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

10

<210> 1

<211> 1446

<212> ADN

<213> Un ADN genómico de hexuronato C4-epimerasa

15

<400> 1

	atggtcttga aagtgttcaa agaccacttt ggaaggggat acgaagtta cgaaaagtct	60
	tatagagaaa aggattctct ttctttcttc ttgacaaagg aagaggaagg aaaaattctg	120
20	gtggtggctg gagaaaaggc acctgaaggt ctgtcgtttt tcaaaaaaca gcgggcggag	180
	ggtgtttcgt tctttttctg tgagagaaat catgagaact tggaagttct cagaaaatac	240
25	tttcagatc tcaaaccagt tcgagcggga ttgagagcgt cttttggaac aggtgacaga	300
	ctcgggatca ccacaccggc tcacgtgagg gcggtgaagg attcagggct ttttcccatc	360
	tttgccgagc agtcggtgag ggagaacgag agaacgggaa ggacctggag agatgtgctg	420
30	gacgatgcca catggggagt tttccaggag ggatacagtg agggattcgg agcggatgca	480
	gaccatgtga agcggccgga ggatcttgtt tcggctgcaa ggaaggttt caccatgttc	540
35	acaatcgatc cttcggatca tgtgaggaat ctttcaaac ttacagaaa ggaagaaat	600
	gagaaattcg aagagattct gagaaaggaa aggatcgaca ggatctatct cggtaagaaa	660
	tactctgttc tcggtgagaa gatcgaattc gatgagaaga atctcagaga tgcggcgctc	720
40	gtgtattacg atgcgattgc ccacgtggat atgatgtatc aaatthtgaa agacgaaacc	780
	ccggatttcg acttcgaagt gtcagttgac gaaacagaaa ctctctacgag tcctctcttc	840
45	cacatthtcg ttgtggaaga actcagacga agaggtgtgg agttcaccaa tcttgccctg	900
	agattcatcg gcgaatggga aaaggaata gattacaagg gggatcttgc acagttcgag	960
	agagaaatca aatgcacgc agaaatcgca aggatgttcg aaggatacaa aatatactc	1020
50	cactctggaa gcgacaaatt ttccgtgtat cctgcttttg cttccgcgac aggaggcctt	1080
	ttccacgtga agacagccgg aacgagttat cttgagggcg tgaaggtcat atccatggtc	1140
55	aaccgggagc tcttccggga gatctacagg tgtactctcg atcactthga ggaagacaga	1200
	aagtcctatc acatatctgc ggatctgtcg aaagttccgg aagtagagaa agtgaaagat	1260

60

65

ES 2 751 691 T3

	gaagatcttc caggtctttt tgaagacatc aacgtgagac agttgatcca cgtcacctac	1320
	ggctctgttc tgaaagatgc atctttgaaa gaacggctat ttaagacgct tgaacaaaac	1380
5	gaggaactct tttacgaaac tgtggcaaaa catataaaaa ggcacgtgga tctgctggag	1440
	gggtga	1446
10	<210> 2 <211> 1446 <212> ADN <213> Un ADN genómico de hexuronato C4-epimerasa	
15	<400> 2	
	atggtcttga aagtgttcaa agatcacttt ggaaggggat acgaagtta cgaaaagtct	60
	tatagagaaa aggattctct ctctttcttc ttgacaaagg gagaggaagg aaaaattctg	120
20	gtagtggctg gagaaaaggc acctgagggt ctgtcgtttt tcaaaaaaca gcgggtggag	180
	ggtgtttcgt tctttttctg tgagagaaat catgagaact tggaagttct cagaaaatac	240
25	tttcagatc tcaaaccagt tcgagcggga ttgagagcgt cttttggaac aggtgacaga	300
	ctcggatca ccacaccggc tcacgtgagg gcggtgaagg attcagggt ttttcccatc	360
	tttgccgagc agtcggtgag ggagaacgag agaacgggaa ggacctggag agatgtgctg	420
30	gacgatgcca catggggagt tttccaggag ggatacagtg agggattcgg agcagacgcc	480
	gatcacgtga agcggccgga ggatcttgtt tcggctgcaa ggaaggttt caccatgttc	540
35	acaatcgatc cttcggatca tgtgaggaat ctttcaaac tcagtgaaag agaaaagaac	600
	gagatgttcg aggaaatact gaaaaagag cgaatcgaca ggatctatct tgggaaaaaa	660
	tacaccgtcc tcggtgaaag actggagttc gacgagaaaa atttgagggga tgctgctctg	720
40	gtgtactatg atgcatcgc ccacgtggat atgatgtatc aaattttgaa agacgaaacc	780
	ccggatttcg acttcgaagt gtcagttgac gaaacagaaa ctcccacgag tcctctcttc	840
45	cacattttcg ttgtggaaga actcagacga agaggtgtgg agttcaccaa tcttgccctg	900
	agattcatcg gcgaatggga aaaggaata gattacaagg gggatcttgc acagttcgag	960
	agagaaatca aatgcacgc agaaatcgca aggatgttcg aaggatacaa aatatcactc	1020
50	cactctggaa gcgacaaatt ttccgtgat cctgcttttg cttcccgac agggagcctt	1080
	ttccacgtga agacagccgg aacgagttat cttgagcgg tgaaggtcat atccatggtc	1140
55	aaccgggagc tcttccggga gatctacagg tgtgctctcg atcactttga ggaagacaga	1200
	aagtcctatc acatatctgc ggatctgtcg aaagttccgg aagtagagaa agtgaaagat	1260
	gaagatcttc caggtctttt tgaagacatc aacgtgagac agttgatcca tgtcacctat	1320
60	ggctctgttc tgaaagatgc atctttgaaa gaacggctgt ttaagacgct tgaacaaaat	1380
	gaggaactct tctacgagac cgtggcaaaa catataaaaa ggcacgtaga cctgttgaag	1440
65	gggtga	1446

ES 2 751 691 T3

<210> 3
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> Un ADN genómico artificial de Hexuronato C4 epimerasa

5

<400> 3

	atggtcttga aagtgttcaa agatcacttt ggaaggggat acgaaagtta cgaaaagtct	60
10	tatagagaaa aggattctct ctctttcttc ttgacaaagg gagaggaagg aaaaattctg	120
	gtagtggtctg gagaaaaggc acctgagggt ctgtcgtttt tcaaaaaaca gcggttgag	180
15	ggtgtttcgt tctttttctg tgagagaaat catgagaact tggaaagtct cagaaaatac	240
	tttccagatc tcaaaccagt tcgagcagga ttgagagcgt cttttggaac aggtgacaga	300
	ctcggtatca ccacaccggc tcacgtgagg gcggtgaagg attcagggtt ttttcccatc	360
20	tttgccgagc aggacgtgag ggagaacgaa agaacgggaa ggacctggag agatgtgctg	420
	gacgatgcc aatggggagt tttccaggag ggatacagtg agggattcgg agcagacgcc	480
25	gatcacgca agcggccgga ggatcttgtt tccgctgcaa ggaaggttt caccatgttc	540
	acaatcgatc cttcgaatca tgtgaggaat ctttcaaac tcagtgaaag agaaaagaac	600
	gagatgttcg aggaaatact gaaaaagag cgaatcgaca ggatctatct tgggaaaaaa	660
30	tacaccgtcc tcggtgaaag actggagttc gacgagaaaa atttgagga tgctgctctg	720
	gtgtactatg atgcgatcgc ccacgtggat atgatgtatc aaattttgaa agacgaaacc	780
35	ccggatatcg acttcgaagt gtcagttgac gaaacagaaa ctcccacgag tcctctcttc	840
	cacattttcg ttgtggaaga actcagacga agaggtgtgg agttcaccaa tcttgccctg	900
	agattcatcg gcgaatggga aaagggataa ggttacaagg gggatcttgc acagttcgag	960
40	agagaaatca aaatgcacgc agaaatcgca aggatgttcg aaggatacaa aatatcactc	1020
	cactctggaa gcgacaaatt ttccgtgtat cctgcttttg cttccgagc agggagcctt	1080
45	ttccacgtga agacagccgg aacgagttat cttgagggcg tgaaggtcat atccatggtc	1140
	aaccgggagc tcttccggga gatctacagg tgtgctctcg atcactttga ggaagacaga	1200
	aagtcctatc acatatctgc ggatctgtcg aaagttccgg aagtagagaa agtgaaagat	1260
50	gaagatcttc caggcttttt tgaagacatc aacgtgagac agttgatcca tgtcacctat	1320
	ggctctgttc tgaagatgc atctttgaaa gaacggctgt ttaagacgct tgaacaaaat	1380
55	gaggaactct tctacgagac cgtggcaaaa catataaaaa ggcacgtaga cctggtgaag	1440
	gggtgactcg agcaccacca ccaccaccac tga	1473

<210> 4
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Hexuronato C4 epimerasa artificial

60

<400> 4

65

ES 2 751 691 T3

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

ES 2 751 691 T3

	Arg	Glu	Ile	Lys	Met	His	Ala	Glu	Ile	Ala	Arg	Met	Phe	Glu	Gly	Tyr
					325					330					335	
5	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
10				355				360					365			
	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ala	Val	Lys	Val	Ile	Ser	Met	Val	Asn	Pro	Glu	Leu
		370					375					380				
15	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
20				405						410					415	
	Lys	Val	Lys	Asp	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Asp	Ile	Asn	Val
				420					425					430		
25	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
30		450					455					460				
	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Arg	His	Val	Asp	Leu	Leu	Lys
	465					470					475					480
35	Gly															
40																
45																
50																
55																
60																
65																

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de tagatosa, que comprende:
 - a) realizar la epimerización de fructosa usando hexuronato C4-epimerasa producida a partir de una cepa transformada con cualquier secuencia de ADN representada por las SEQ ID NO: 1 a 3 para obtener un producto epimerizado que comprende tagatosa;
 - b) purificar el producto epimerizado; y
 - c) cristalizar el producto epimerizado purificado.
2. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa es *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Aspergillus oryzae* o *Bacillus subtilis*.
3. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cepa de producción de hexuronato C4-epimerasa es *E. coli* BL21(DE3) pET21a-TM (número de acceso: KCCM11542P), *E. coli* BL21(DE3) pET21a-TN (número de acceso: KCCM11543P), o *E. coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) (número de acceso: KCCM11544P).
4. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de epimerización comprende hacer reaccionar fructosa y hexuronato C4-epimerasa a una temperatura que varía de 60 °C a 90 °C y un pH de 5 a 8.
5. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa de epimerización se realiza en presencia de una sal metálica.
6. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la sal metálica comprende al menos uno de NiSO₄, NiCl₂, CoCl₂, MnCl₂ y ZnSO₄.
7. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto epimerizado comprende tagatosa en una cantidad de 0,05% en peso o más.
8. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fructosa se produce mediante hidrólisis de sacarosa o isomerización de glucosa.
9. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de purificación se realiza por al menos una de cromatografía, cristalización fraccionada y purificación iónica.
10. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la decoloración, desalación o ambas de decoloración y desalación se realizan antes o después de la etapa de purificación.
11. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto epimerizado purificado es concentrado antes de la etapa de cristalización.
12. El procedimiento de producción de tagatosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que, después de la etapa b), la fructosa sin reaccionar se recicla a la etapa a), o después de la etapa c), el alimento del cual se separan los cristales se recicla a la etapa b), o se realizan ambas etapas.
13. *Escherichia coli* BL21(DE3)pET21a-TM (número de acceso: KCCM11542P), *Escherichia coli* BL21(DE3) pET21a-TN (número de acceso: KCCM11543P) o *Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a-TN(m) (número de acceso: KCCM11544P).
14. Un mutante de hexuronato C4-epimerasa representado por la SEQ ID NO: 4.

Fig. 1

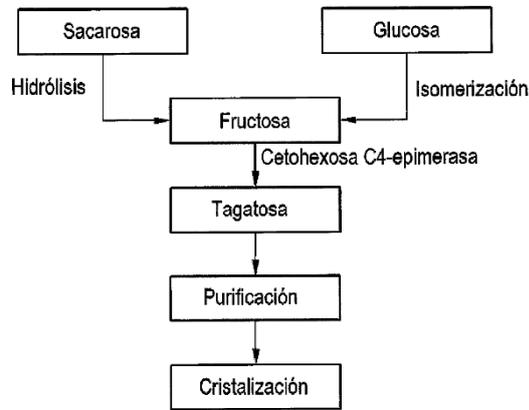


Fig. 2

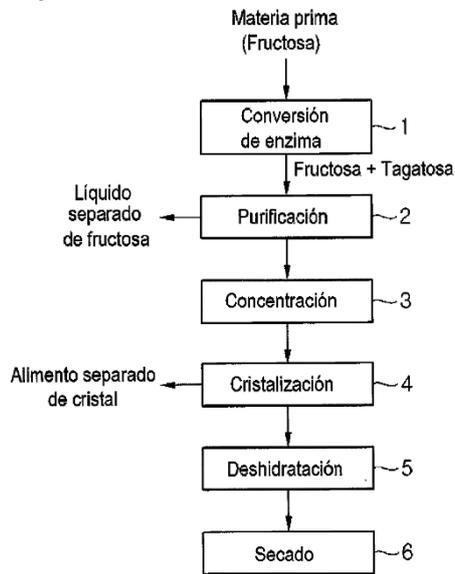


Fig. 3

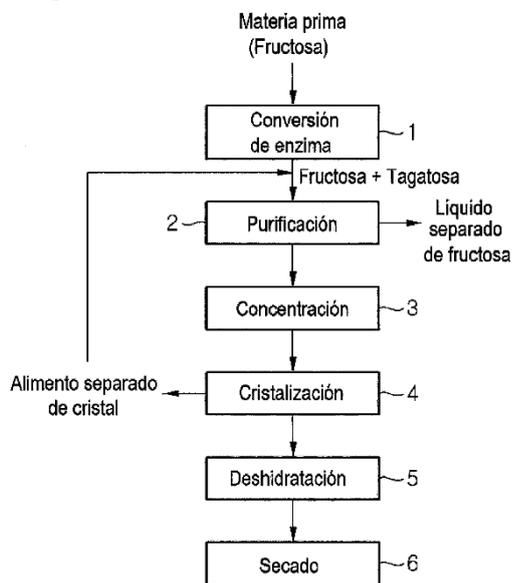


Fig. 4

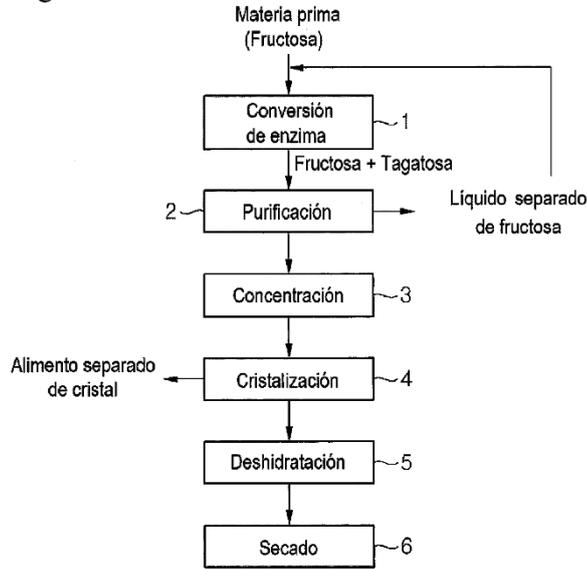


Fig. 5

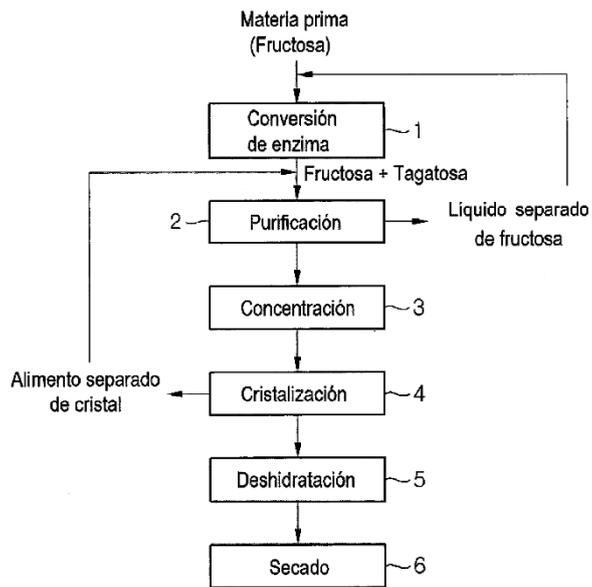


Fig. 6

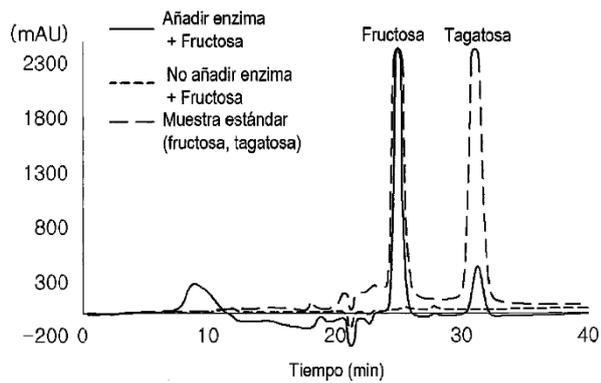


Fig. 7

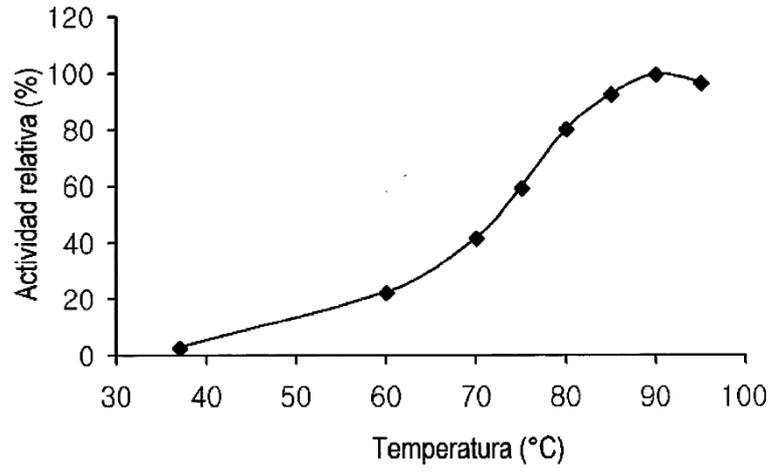


Fig. 8

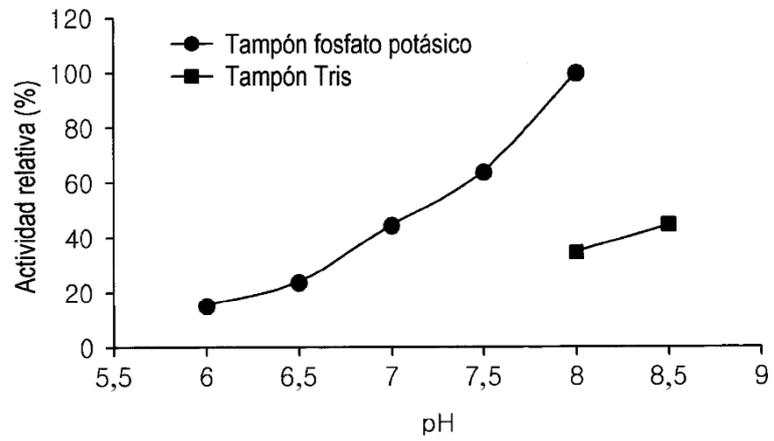


Fig. 9

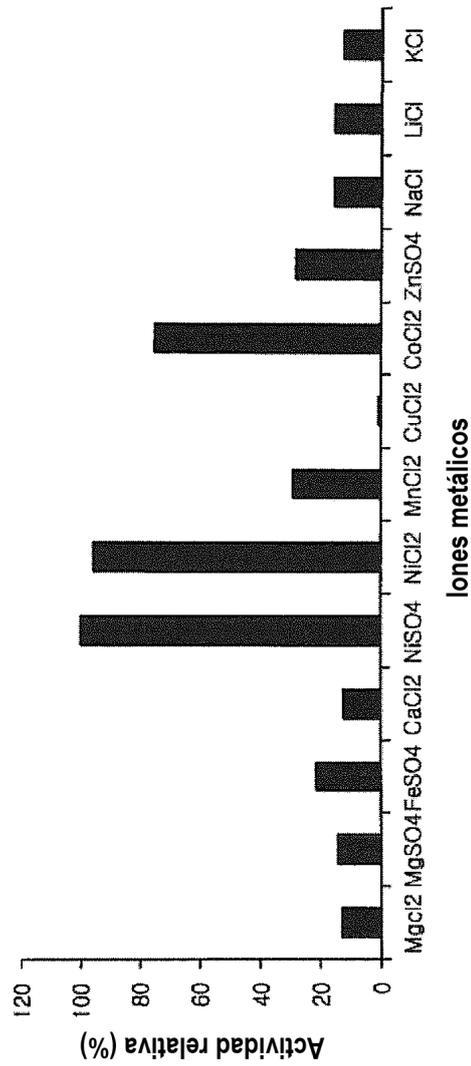


Fig. 10

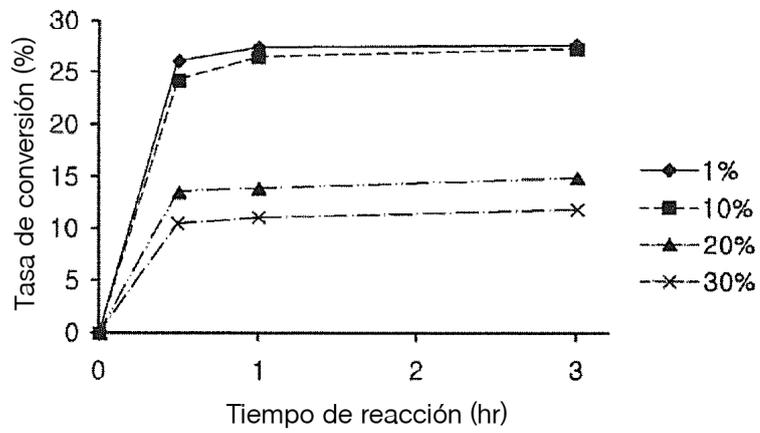


Fig. 11

