



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/195 (2019.05); C12N 9/90 (2019.05); C12P 19/02 (2019.05); C12P 19/24 (2019.05); C12N 1/20 (2019.05); C12N 15/63 (2019.05); C12Y 501/03 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017113926, 19.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.10.2015

Дата регистрации:
30.09.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.10.2014 KR 10-2014-0143703

(43) Дата публикации заявки: 22.11.2018 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 30.09.2019 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.05.2017(86) Заявка РСТ:
KR 2015/011007 (19.10.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/064146 (28.04.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛИ Йоунг Ми (KR),
КИМ Йанг Хее (KR),
ЯНГ Сунг Дзае (KR),
ПАРК Ил Хианг (KR),
КИМ Сеонг Бо (KR),
ЧО Хиун Куг (KR),
ПАРК Сеунг Вон (KR)

(73) Патентообладатель(и):

СиДжей ЧЕИЛДЗЕДАНГ КОРПОРЕЙШН
(KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: NCBI Reference Sequence:
WP_012844026.1, 18.05.2013. NCBI Reference
Sequence: WP_011943119.1, 16.05.2013. NCBI
Reference Sequence: WP_012002872.1, 16.05.2013.
NCBI Reference Sequence: WP_013150657,
18.05.2013. NCBI Reference Sequence:
WP_012582608.1, 17.05.2013. NCBI Reference
Sequence: WP_013788787.1, 18.05.2013. NCBI
Reference Sequence: (см. прод.)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТАГАТОЗЫ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТАГАТОЗЫ ИЗ ФРУКТОЗЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к получению тагатозы из фруктозы. Предложен белок для получения тагатозы из фруктозы, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-7. Предложен также рекомбинантный микроорганизм для получения тагатозы из фруктозы, экспрессирующий указанный белок. Предложен

также способ получения тагатозы из фруктозы, включающий приведение в контакт вышеуказанных белка или микроорганизма с фруктозой и получение тагатозы. Изобретение обеспечивает получение тагатозы из фруктозы с высоким выходом. 3 н. и 18 з.п. ф-лы, 42 ил., 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

WP_006569468.1, 28.05.2013. KIM HJ ET AL. Novel activity of UDP-galactose-4-epimerase for free monosaccharide and activity improvement by active site-saturation mutagenesis. Appl Biochem Biotechnol. 2011 Feb;163(3):444-51.
WANARSKA M. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting β -D-galactosidase from *Arthrobacter chlorophenolicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter* sp. 22c. Microbial Cell Factories, 2012, 11:113. RU 2451688 C2, 27.05.2012.

R U 2 7 0 1 6 6 9 C 2

R U 2 7 0 1 6 6 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/195 (2019.05); *C12N 9/90* (2019.05); *C12P 19/02* (2019.05); *C12P 19/24* (2019.05); *C12N 1/20* (2019.05); *C12N 15/63* (2019.05); *C12Y 501/03* (2019.05)

(21)(22) Application: **2017113926, 19.10.2015**(24) Effective date for property rights:
19.10.2015Registration date:
30.09.2019

Priority:

(30) Convention priority:
22.10.2014 KR 10-2014-0143703(43) Application published: **22.11.2018 Bull. № 33**(45) Date of publication: **30.09.2019 Bull. № 28**(85) Commencement of national phase: **22.05.2017**(86) PCT application:
KR 2015/011007 (19.10.2015)(87) PCT publication:
WO 2016/064146 (28.04.2016)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**LI Joung Mi (KR),
KIM Jang Khee (KR),
YANG Sung Dzae (KR),
PARK Il Khiang (KR),
KIM Seong Bo (KR),
CHO Khiun Kug (KR),
PARK Seung Von (KR)**

(73) Proprietor(s):

**SiDzhej CHEILDZEDANG KORPOREJSHN
(KR)**

(54) **COMPOSITION FOR PRODUCING TAGATOSE AND METHOD FOR PRODUCING TAGATOSE FROM FRUCTOSE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to production of tagatose from fructose. Disclosed is a protein for producing tagatose from fructose, having an amino acid sequence presented in SEQ ID NO: 1-7. Also disclosed is a recombinant microorganism for producing tagatose from fructose, which expresses said

protein. Also disclosed is a method for producing tagatose from fructose, involving contacting said protein or microorganism with fructose and producing tagatose.

EFFECT: invention provides producing tagatose from fructose with high output.

21 cl, 42 dwg, 2 tbl, 3 ex

RU 2 701 669 C 2

RU 2 701 669 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

[1] Настоящее изобретение относится к композиции для получения тагатозы и способу получения тагатозы из фруктозы, а более конкретно, к гену, кодирующему термофильную фруктозо-4-эпимеразу, полученному из термофильных микроорганизмов, и способу получения тагатозы из фруктозы с использованием указанного фермента.

Уровень техники

[2] Тагатоза представляет собой эпимер D-фруктозы и имеет естественный сладкий вкус почти не отличимый от сахарозы и физические свойства, подобные сахарозе.

Тагатоза является натуральным подсластителем, который присутствует в небольшом количестве в таких пищевых продуктах, как молоко, сыр, какао и тому подобное, и в сладких фруктах, таких как яблоки и мандарины. Калорийность тагатоза - 1,5 ккал/г, что составляет одну треть от калорийности сахарозы, а гликемический индекс (ГИ) равен 3, что составляет 5% от ГИ сахарозы. Тагатоза имеет сладкий вкус, подобный сахарозе, и обеспечивает различные преимущества для здоровья. В этой связи, тагатоза может быть использована в самых разнообразных продуктах в качестве альтернативного подсластителя, удовлетворяющего вкусовым требованиям, полезного с точки зрения здоровья.

[3] Известно, что тагатоза может быть получена из галактозы химическим способом (каталитическая реакция) или биологическим способом (ферментативная реакция изомеризации) (выложенная публикация патента Кореи № 2009-0082774, опубликованная 31 июля 2009г.). Для обеспечения экономически целесообразного производства галактозы в качестве исходного материала для вышеуказанных реакций, были проведены исследования по разработке различных сырьевых материалов, содержащих галактозу, способа получения галактозы и способа получения тагатозы с использованием указанных сырьевых материалов. В качестве наиболее репрезентативного сырья для галактозы была использована лактоза. Однако цена лактозы или содержащих лактозу продуктов является нестабильной и зависит от объема выработки, спроса и предложения сырого молока и лактозы на мировом рынке и тому подобного. Такие колебания цен нарушают стабильные поставки сырья для получения тагатозы.

[4] В частности, примерно в 2012 году, резкий рост мировых цен на лактозу был в основном обусловлен быстрым ростом спроса на сухое обезжиренное молоко и сухое цельное молоко, содержащее лактозу, из-за быстрого экономического роста в Китае и снижения годового объема производства молока в странах-производителях молока, вызванного глобальным потеплением. Такие колебания цен на сырье препятствуют стабильному производству тагатозы. Соответственно, существует необходимость в создании нового способа получения тагатозы с использованием общих сахаридов (сахарозы, глюкозы, фруктозы и им подобных).

Описание

Техническая проблема

[5] В прошлом, тагатозу получали с использованием галактозы, получаемой при разложении различных биологических ресурсов, таких как сывороточный пермеат, который является растворимым побочным продуктом в качестве пищевого сырья, кроме лактозы, и древесина лиственницы, которая является растительной биомассой.

[6] Однако подходящее сырье, которое является коммерчески доступным или коммерциализация которого целесообразна с точки зрения наличия стабильных поставок сырья и эффективности инвестиций, отсутствует.

[7] Таким образом, одна из задач настоящего изобретения состоит в создании композиции для получения тагатозы из общих сахаридов, более подходящих для

применения в промышленности по сравнению с предыдущими способами получения тагатозы из галактозы, а также к способу получения тагатозы.

5 [8] В частности, настоящее изобретение направлено на создание нового белка-фермента, функция которого не известна из уровня техники, и который имеет D-фруктозо-4-эпимеразную активность и обеспечивает возможность получения тагатозы из фруктозы с высоким выходом, гена, кодирующего указанный белок, композиции для получения тагатозы с использованием указанного белка, и к способу получения тагатозы из фруктозы.

Техническое решение

10 [9] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции для получения тагатозы из фруктозы, содержащей: белок, имеющий аминокислотную последовательность приведенную в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7, или микроорганизм, экспрессирующий указанный белок.

15 [10] Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения тагатозы из фруктозы, включающий: взаимодействие композиции по настоящему изобретению с фруктозой.

Благоприятные эффекты

20 [11] Настоящее изобретение может обеспечить способ получения тагатозы, который является экономичным и обеспечивает высокий выход, с использованием широко распространенного сырьевого материала, фруктозы, путем разработки новой D-фруктозо-4-эпимеразы, которая обладает активностью, обеспечивающей возможность получения тагатозы путем эпимеризации фруктозы по атому углерода 4.

25 [12] Кроме того, настоящее изобретение может обеспечить способ получения тагатозы, который является экономичным и обеспечивает высокий выход, с использованием широко распространенного сырьевого материала, фруктозы, вместо лактозы цена на которую колеблется в достаточно широком диапазоне, тем самым снижая затраты на производство.

30 [13] В общем случае, поскольку в данной области техники хорошо известно, что фруктозу можно получать в промышленных масштабах из глюкозы или сахарозы, сырьевые материалы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают не только фруктозу, но и сырьевые материалы полностью или частично состоящие из фруктозы, что позволяет обеспечить более экономичное производство. А именно, настоящее изобретение охватывает получение тагатозы через ферментативную конверсию крахмала, сахара-сырца или сахарозы.

35 [14] Кроме того, настоящее изобретение позволяет получать тагатозу из фруктозы, что обеспечивает эффективное массовое производство тагатозы, которая рассматривается в настоящее время в качестве важного пищевого материала.

Описание чертежей

40 [15] На фиг. 1a-1g показаны карты расщепления рекомбинантных векторов для экспрессии семи D-фруктозо-4-эпимераз, полученных из каждого термофильного микроорганизма.

[16] На фиг. 2a-2g показаны диаграммы ВЭЖХ, отображающие семь путей получения тагатозы, полученной из термофильных микроорганизмов в результате взаимодействия D-фруктозо-4-эпимеразы с фруктозой, используемой в качестве субстрата.

45 [17] На фиг. 3a-3g показаны графики активности семи D-фруктозо-4-эпимераз, полученных из термофильных микроорганизмов, в зависимости от температуры.

[18] На фиг. 4a-4g показаны графики активности семи D-фруктозо-4-эпимераз, полученных из термофильных микроорганизмов, в зависимости от изменения pH.

[19] На фиг. 5a-5g показаны графики активности семи D-фруктозо-4-эпимераз, полученных из термофильных микроорганизмов, в зависимости от видов ионов металлов.

[20] На фиг. 6a-6g показаны аминокислотные последовательности белков, приведенных в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7, полученных из каждого из семи термофильных микроорганизмов.

Наилучший вариант осуществления

[21] Далее приведено более подробное описание настоящего изобретения на основе конкретных вариантов осуществления. Настоящее изобретение не следует ограничивать указанными вариантами осуществления. Описания деталей, очевидных для специалистов в данной области техники, обладающих обычными знаниями в данной области техники или соответствующей области, в данном документе опущены.

[22] Как использовано в данном описании, термин "атом углерода в положении n (далее C_n)" относится к положению углерода, определенному в соответствии с номенклатурой IUPAC, в которой n означает целое число, равное 1 или более. Например, "эпимеризация по атому углерода в 4-м положении" выражаются как "C4-эпимеризация".

[23] Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к композиции для получения тагатозы из фруктозы, которая содержит: белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7, или микроорганизм, экспрессирующий указанный белок.

[24] Как правило, моносахариды могут быть классифицированы как относящиеся к альдогексозам и кетогексозам. Альдогексоза представляет собой альдозу, которая имеет шесть атомов углерода, и альдегидную группу на одном конце. Примеры альдогексоз включают глюкозу, галактозу, аллозу, гулозу, альтрозу, маннозу, талозу и идозу, но не ограничиваются ими.

[25] Кроме того, кетогексоза представляет собой моносахарид, имеющий шесть атомов углерода и кетогруппу. Примеры кетогексоз включают фруктозу, тагатозу, психозу и сорбозу, но не ограничиваются ими. В частности, фруктоза используется в качестве кетогексозы. Как используется в настоящем документе, как фруктоза так и тагатоза представляют собой D-фруктозу и D-тагатозу, если не указано иное.

[26] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, аминокислотная последовательности, представленная в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7 может, представлять собой фермент, который обладает активностью позволяющей получить тагатозу путем эпимеризации фруктозы по атому углерода 4.

[27] В частности, авторы настоящего изобретения использовали микроорганизмы, принадлежащие к термофильным родам *Rhodothermus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermotoga* и *Dictyoglomus*. Так как ферменты, полученные из термофильных микроорганизмов, имеют ту же функцию, что и ферменты, полученные из мезофильных микроорганизмов, они могут стабильно взаимодействовать в экстремальных условиях (высокая температура или т.п.), что позволяет предотвратить загрязнение мезофильными микроорганизмами, повысить растворимость материалов, имеющих низкую растворимость в субстратах, и увеличить скорость реакции; ферменты, полученные из термофильных микроорганизмов, позволяют преодолеть недостатки мезофильных ферментов, связанные с их использованием в промышленных масштабах. Авторы настоящего изобретения выполнили скрининг фруктозо-4-эпимераз из вышеупомянутых термофильных микроорганизмов, а затем среди их нативных генов идентифицировали новые полинуклеотиды, которые экспрессируют ферменты, способные превращать фруктозу в тагатозу. Настоящее изобретение относится к ферменту, превращающему

фруктозу в тагатозу, получаемому в результате синтеза полинуклеотидной последовательности, оптимизированной для эффективной повышенной экспрессии белка, посредством введения полинуклеотида в рекомбинантный вектор и экспрессии фермента.

5 [28] Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO: 7, может быть трансформирована с помощью рекомбинантного вектора, включающего ген, который кодирует белок, имеющий указанную выше последовательность.

[29] Примеры используемых для трансформации микроорганизмов включают *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-RM (номер доступа: KCCM11576P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAM (номер доступа: KCCM11577P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAS (номер доступа: KCCM11578P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAX (номер доступа: KCCM11579P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TP (номер доступа: KCCM11580P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TL (номер доступа: KCCM11581P) и *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-DT (номер доступа: KCCM11582P), которые были
15 депонированы в Корейском центре культур микроорганизмов (KCCM)(361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea) 6 октября 2014г. под номерами доступа KCCM11576P, KCCM11577P, KCCM11578P, KCCM11579P, KCCM11580P, KCCM11581P и KCCM11582P, соответственно.

[30] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий
20 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, может представлять собой фермент, полученный из *Rhodothermus marinus*.

[31] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 60 кДа, оптимальную температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 6,0 до 9,0.

[32] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от
25 60°C до 80°C, а оптимальный pH активности может составлять от 7,0 до 9,0.

[33] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, может представлять собой фермент, полученный из *Thermotoga petrophila*.

[34] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 58 кДа, оптимальную
30 температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 7,0 до 9,0.

[35] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 70°C до 90°C.

[36] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, может
35 представлять собой фермент, полученный из *Thermotoga lettingae*.

[37] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 7,0 до 9,0.

[38] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 60°C до 80°C.

40 [39] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, может представлять собой фермент, полученный из *Thermoanaerobacter mathranii*.

[40] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 7,0 до 10,0.

45 [41] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 70°C до 90°C, а оптимальный pH активности может составлять от 8,0 до 10,0.

[42] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, может

представлять собой фермент, полученный из *Dictyoglomus turgidum*.

[43] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 7,0 до 9,0.

[44] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 5 60°C до 80°C.

[45] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, может представлять собой фермент, полученный из *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*.

[46] Белок может иметь молекулярную массу от 53 кДа до 58 кДа, оптимальную 10 температуру активности от 50°C до 90°C и оптимальный pH активности от 6,0 до 9,0.

[47] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 60°C до 80°C, и оптимальный pH активности может составлять от 6,0 до 8,0.

[48] В частности, в одном из вариантов осуществления белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7 может 15 представлять собой фермент, полученный из *Thermoanaerobacter siderophilus*.

[49] Белок может иметь молекулярную массу от 55 кДа до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50°C до 80°C и оптимальный pH активности от 7,0 до 10,0.

[50] Более конкретно, оптимальная температура активности может составлять от 60°C до 80°C, и оптимальный pH активностью может составлять от 8,0 до 10,0.

[51] Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу 20 получения тагатозы из фруктозы, который включает: взаимодействие композиции по любому одному из вариантов осуществления настоящего изобретения с фруктозой.

[52] В частности, реакция может быть проведена при температуре от 50°C до 80°C.

[53] Кроме того, реакцию можно проводить при pH от 6,0 до 9,0.

[54] Помимо этого, реакция может быть выполнена путем дополнительного 25 добавления ионов магния, ионов цинка, ионов никеля, ионов кобальта, ионов железа, ионов марганца или их смеси.

[55] Кроме того, в качестве субстрата может присутствовать фруктоза в концентрации от 5% (вес/объем) до 60% (вес/объем).

[56] В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения 30 фруктоза может быть получена из сахарозы или глюкозы. В результате, настоящее изобретение может обеспечить способ получения тагатозы с высоким выходом с использованием распространенных и недорогих сырьевых материалов, таких как глюкоза, фруктоза, сахароза и т.п., что обеспечивает возможность серийного 35 производства тагатозы.

[57] Соответственно, настоящее изобретение может дополнительно включать гидролиз сахарозы или изомеризацию глюкозы для получения фруктозы перед проведением реакции композиции по любому одному из вариантов осуществления настоящего изобретения с фруктозой.

[58] Ферменты, используемые в гидролизе, могут представлять собой по меньшей 40 мере один, выбранный из группы, состоящей из β-D-фруктозидазы, включая β-фруктофуранозидазу, инвертазы, сахаразы и им подобных; сахаразы, α-глюкозидазы, и α-D-глюкогидролазы, но не ограничиваются ими.

[59] Примеры фермента, изомеризирующего глюкозу, могут включать 45 глюкозоизомеразу и фосфоглюкоизомеразу, но не ограничиваются ими.

[60] Пример

[61] Пример 1. Получение рекомбинантного микроорганизма, продуцирующего D-фруктозо-4-эпимеразу

[62] Полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7 (Фиг 6а-6г), показанные в таблице 1, полученные из семи термофильных микроорганизмов, были вставлены в сайт рестрикции в векторе экспрессии pET21a (Novagen) с использованием ферментов рестрикции NdeI и XhoI, получая таким образом рекомбинантные векторы pET21a-RM, pET21a-TAM, pET21a-TAS, pET21a-TAX, pET21a-TP, pET21a-TL и pET21a-DT (Фиг. 1а-1г).

Рекомбинантные векторы были обработаны методом теплового шока (Sambrook and Russell: Molecular Cloning) для трансформации *E.coli* BL21 (DE3) (Invitrogen), получая таким образом рекомбинантный микроорганизм.

[63] Таблица 1

Список термофильных микроорганизмов

RM	<i>Rhodothermus marinus</i>
TAM	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>
TAS	<i>Thermoanaerobacter siderophilus SR4</i>
TAX	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>
TP	<i>Thermotoga petrophila</i>
TL	<i>Thermotoga lettingae</i>
DT	<i>Dictyoglomus turgidum</i>

[64] Трансформированный рекомбинантный микроорганизм инокулировали в 5 мл LB среды с ампициллином (Difco), культивировали при температуре 37°C при встряхивании при 180 об./мин до тех пор, пока поглощение (ОП) при 600 нм не достигло 1,5, а затем инокулировали в 500 мл LB среды с ампициллином. Затем к полученной массе добавляли 5 мМ лактозы для того, чтобы индуцировать повышенную экспрессию целевого фермента, с последующим культивированием в инкубаторе-качалке при температуре 37°C. Культивирование при температуре 37°C и 180 об./мин проводили в течение 16 часов. После этого полученную массу центрифугировали при 4000 об./мин в течение 20 минут для сбора только рекомбинантных микроорганизмов.

[65] Полученные таким образом рекомбинантные микроорганизмы обозначены следующим образом: *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-RM (номер доступа: KCCM11576P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAM (номер доступа: KCCM11577P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAS (номер доступа: KCCM11578P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAX (номер доступа: KCCM11579P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TP (номер доступа: KCCM11580P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TL (номер доступа: KCCM11581P) и *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-DT (номер доступа: KCCM11582P), которые были депонированы в Корейском центре культур микроорганизмов (KCCM)(361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea) 6 октября 2014г. под номерами доступа KCCM11576P, KCCM11577P, KCCM11578P, KCCM11579P, KCCM11580P, KCCM11581P и KCCM11582P, соответственно.

[66] **Пример 2. Очистка и идентификация свойств D-фруктозо-4-эпимеразы**

[67] **2-1. Очистка D-фруктозо-4-эпимеразы**

[68] Семь микроорганизмов, собранных в примере 1, растворяли в буфере для лизиса (50 мМ К-фосфат), а затем разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора при 4°C в течение 10 минут. Жидкость, полученную в результате разрушения, подвергали термической обработке в инкубаторе-качалке при температуре 60°C в течение 30 минут, а затем центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 минут с получением супернатантов. Полученные супернатанты наносили на Q-сефарозу DEAE, уравновешенную буфером для лизиса, затем последовательно промывали 50 мМ К-фосфатом и буферным раствором, содержащим 200 мМ NaCl, тем самым очищая

искомые белки. Элюированные белки подвергали диализу против буферного раствора для оценки активности фермента (50 мМ К-фосфат, рН 7), который затем использовали в следующем эксперименте. Кроме того, семь очищенных D-фруктозо-4-эпимераз, RM, TAM, TAS, TAX, TP, TL и DT были подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), при этом было установлено, что они имеют молекулярную массу примерно 58 кДа, 56кДа, 56кДа, 55кДа, 56кДа, 57кДа и 57кДа, соответственно.

[69] 2-2. Анализ активности D-фруктозо-4-эпимеразы в зависимости от изменений температуры и рН

[70] Для определения активности семи D-фруктозо-4-эпимераз, очищенных в примере 2-1, в зависимости от изменений рН и температуры ферменты подвергали взаимодействию с фруктозным субстратом при различных рН и температурах.

[71] Измерение активности проводили по результатам реакции 50 мМ фруктозы, 1 мг/мл ферментов и 0,1 мм NiSO₄ при каждом значении рН и температуры диапазона, с последующим охлаждением продукта реакции льдом, а затем анализировали с помощью ВЭЖХ. ВЭЖХ-анализ проводили с использованием колонки SUGAR SP0810 (Shodex) при 80°C в потоке воды в качестве подвижной фазы при скорости потока 0,6 мл/мин, с последующим обнаружением тагатозы с помощью дифференциального детектора показателя преломления для анализа эффективности производства тагатозы.

[72] Во-первых, для оценки активности ферментов при рН 7 в зависимости от изменения температуры, эффективность производства тагатозы измеряли при 40°C - 90°C. В результате, из семи ферментов два фермента, TAM и TP, показали максимальную скорость конверсии при 80°C, в то время как пять ферментов RM, TAS, TAX, TL и DT показали максимальную скорость конверсии при 70°C (фиг. 3а - 3г).

[73] Кроме того, для оценки активности ферментов в зависимости от изменения рН, эффективности производства тагатозы измеряли при 70° С с использованием буферных растворов, состоящих из 50 мМ ацетата натрия, рН 4-6, 50 мМ К-фосфата, рН 6-8, и 50 мМ трис-НСl, рН 7 - рН 9, соответственно. В результате было подтверждено, что ферменты продемонстрировали максимальную активность при различных значениях рН, в частности, высокую активность при рН 7 - рН 9.

[74] В частности, TAX показал высокую активность при рН 7, TP, TL, RM и DT показали высокую активность при рН 8, а TAS и TAM показали высокую активность при рН 9. Кроме того, для буферных растворов с соответствующими вышеуказанными значениями рН было подтверждено, что буферный раствор трис-НСl показал максимальную активность (фиг. 4а - 4г).

[75] Как видно из фиг. 5а-5г, было подтверждено, что ферменты примера 2-1 обеспечивают возможность получения тагатозы из фруктозы.

[76] 2-3. Анализ ионов металлов, требуемых для D-фруктоза-4-эпимеразы

[77] Ранее известные эпимеразы (психозо-3-эпимераза) и изомеразы (глюкозоизомераза, арабинозоизомераза), как известно, требуют присутствия ионов металлов. Была проведена оценка для определения, оказывают ли ионы металлов влияние на D-фруктозо-4-эпимеразы, полученные в примере 2-1.

[78] Семь белков, очищенных в примере 2-1, обрабатывали ионами металлов, используя 1 мМ NiSO₄, NiCl₂, CuCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, MgCl₂, FeSO₄, NaCl, LiCl, KCl или CoCl₂, тем самым измеряя активность фермента. В качестве контрольной группы использовали семь ферментов, не обработанных ионами металлов. Сравнение ферментативной активности ферментов, обработанных различными ионами металлов,

с необработанными ферментами показано на фиг. 5а-5г.

[79] Как показано на фиг. 5а-5г, было подтверждено, что ферменты примера 2-1 демонстрируют повышенную активность при добавлении ионов никеля и ионов кобальта, что указывает на необходимость присутствия ионов металла. В частности, было подтверждено, что NiSO₄ обеспечивает максимальную активность.

[80] Пример 3. Получение тагатозы из фруктозы

[81] Эффективность производства тагатозы измеряли при оптимальных условиях для проведения ферментативной реакции, выбранных в примере 2. В частности, проводили реакцию между 1 мг/мл D-фруктозо-4-эпимеразы, очищенной в примере 2-1, и 20 г/л (в концентрации примерно 110 мМ) фруктозы при температуре реакции, например, 80°C для двух ферментов TAM и TP, 70°C для пяти ферментов RM, TAS, TAx, TL и DT в присутствии 0,1 мМ сульфата никеля, и при pH 7 для TAx, pH 8 для TP, TL, RM и DT и pH 9 для TAS и TAM с использованием буферного раствора 50 мМ Трис-НСl с каждым из соответствующих значений pH.

[82] Анализ методом ВЭЖХ проводили таким же способом, как и в примере 2-2 (фиг. 2а - фиг. 2г). Коэффициент конверсии фруктозы в тагатузу определялся по количеству тагатозы, полученной в результате реакции. Результаты представлены в таблице 2.

[83] Таблица 2

	Концентрация фруктозы(г/л)	Концентрация тагатозы (г/л)	Коэффициент конверсии (%)
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

[84] Раствор, полученный в результате описанной выше реакции (смешанный раствор тагатозы и фруктозы), обесцвечивали (используя активированный уголь), очищали путем ионного обмена, хроматографии, и кристаллизации, получая таким образом кристаллическую тагатузу.

(57) Формула изобретения

1. Белок для получения тагатозы из фруктозы, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-7.

2. Белок по п.1, где белок представляет собой ферментативный белок, превращающий фруктозу в тагатузу путем эпимеризации фруктозы по углероду в положении 4.

3. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1, получают из *Rhodothermus marinus*.

4. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2, получают из *Thermotoga petrophila*.

5. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3, получают из *Thermotoga lettingae*.

6. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4, получают из *Thermoanaerobacter mathranii*.

7. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, получают из *Dictyoglomu sturgidum*.

8. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, получают из *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*.

9. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, получают из *Thermoanaerobacter siderophilus*.

10. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:1, имеет молекулярную массу от 55 до 60 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 90°C и оптимальный pH активности 6,0-9,0.

11. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 90°C и оптимальный pH активности 7,0-9,0.

12. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 90°C и оптимальный pH активности 7,0-9,0.

13. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 80°C и оптимальный pH активности 7,0-10,0.

14. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 90°C и оптимальный pH активности pH 7,0-9,0.

15. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 90°C и оптимальный pH активности 6,0-9,0.

16. Белок по п.1, где белок, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, имеет молекулярную массу от 55 до 58 кДа, оптимальную температуру активности от 50 до 80°C и оптимальный pH активности 7,0-10,0.

17. Рекомбинантный микроорганизм для получения тагатозы из фруктозы, экспрессирующий белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-7.

18. Микроорганизм по п. 17, где микроорганизм трансформирован рекомбинантным вектором, содержащим ген, кодирующий белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1-7.

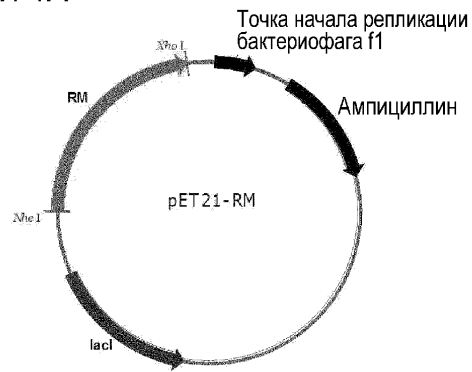
19. Способ получения тагатозы из фруктозы, включающий приведение в контакт белка по любому из пп.1-16 или микроорганизма по п. 17 или 18 с фруктозой и получение тагатозы.

20. Способ получения тагатозы из фруктозы по п.19, в котором приведение в контакт проводят в условиях, соответствующих одному из следующих условий:

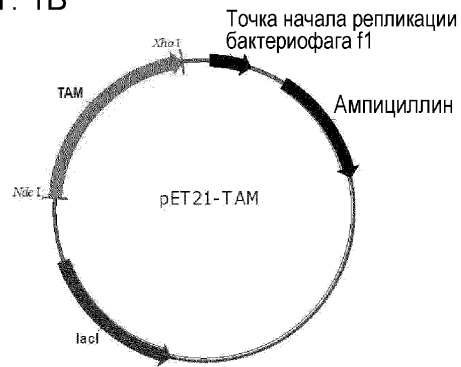
- а) температура от 50 до 80°C,
- б) pH от 6,0 до 9,0 и
- с) концентрация фруктозы от 5 до 60% (вес./об.).

21. Способ получения тагатозы из фруктозы по п.19, дополнительно включающий добавление ионов магния, ионов цинка, ионов никеля, ионов кобальта, ионов железа, ионов марганца или их смеси.

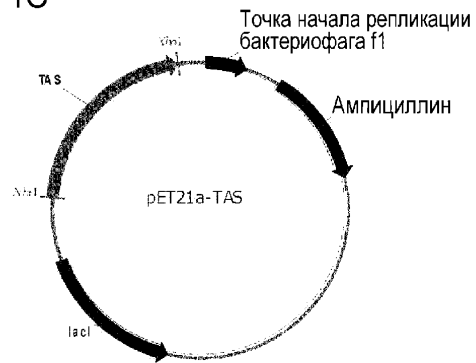
ФИГ. 1А



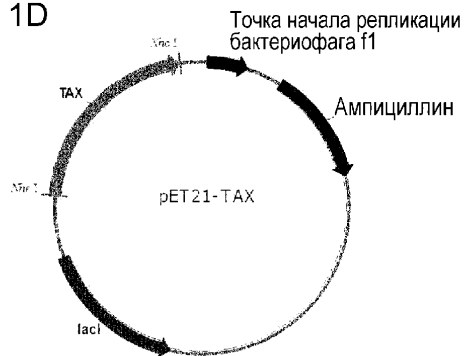
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С

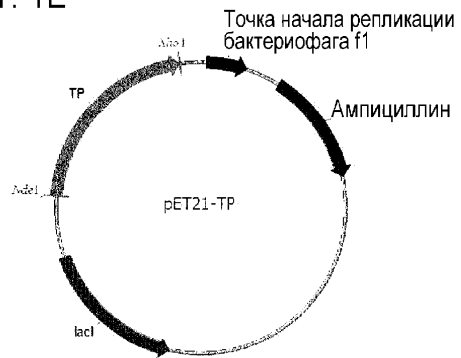


ФИГ. 1D

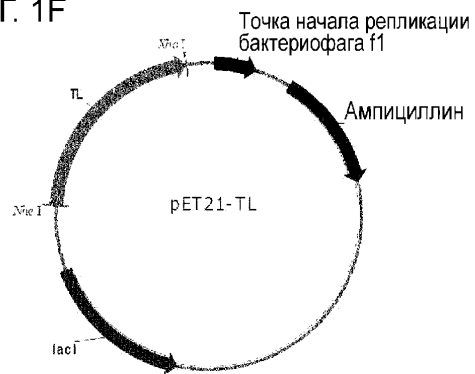


3/21

ФИГ. 1Е

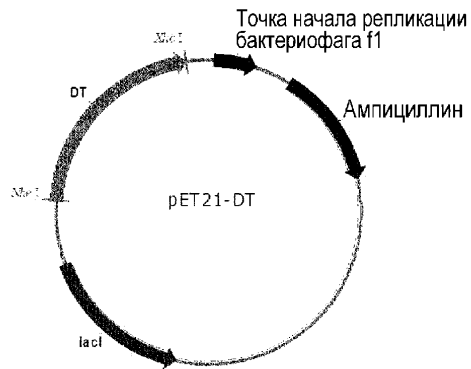


ФИГ. 1F

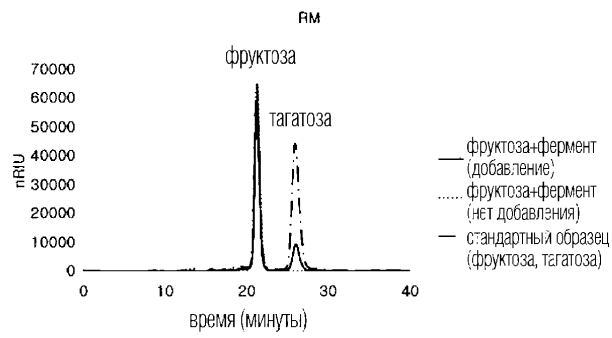


4/21

ФИГ. 1G

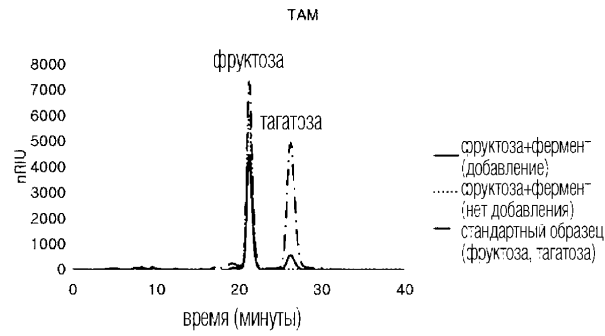


ФИГ. 2A

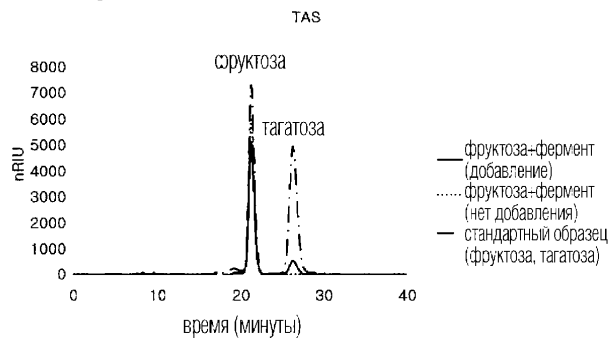


5/21

ФИГ. 2В

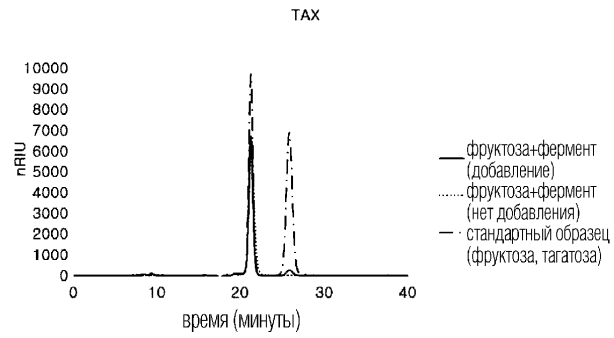


ФИГ. 2С

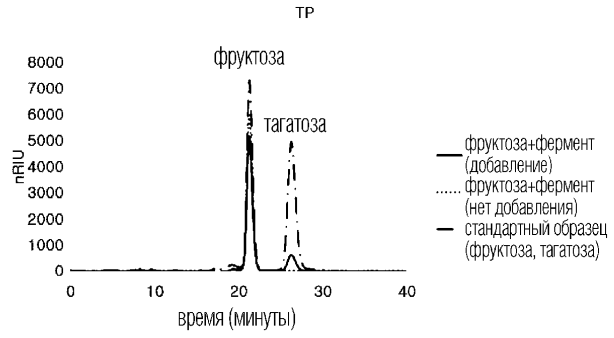


6/21

ФИГ. 2D

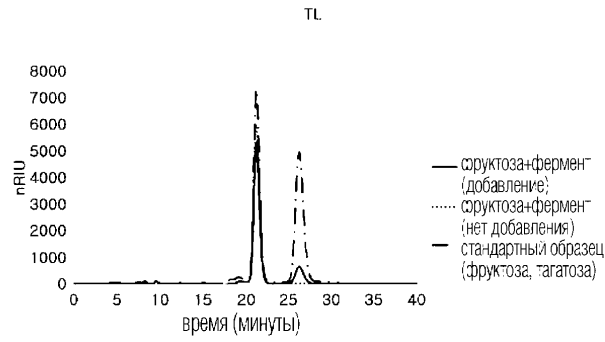


ФИГ. 2E

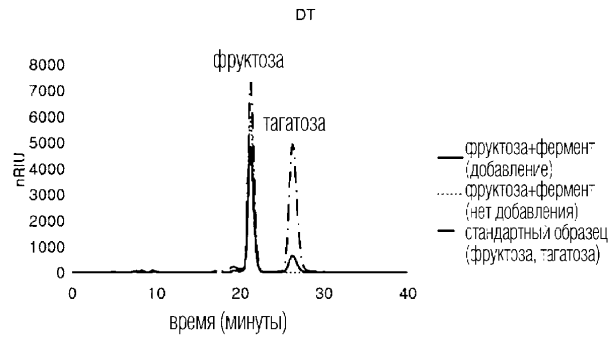


7/21

ФИГ. 2F

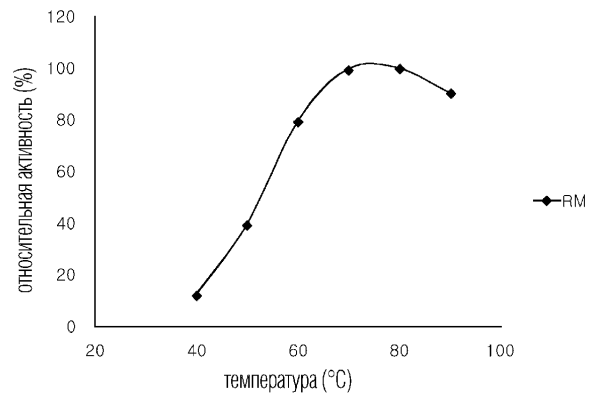


ФИГ. 2G

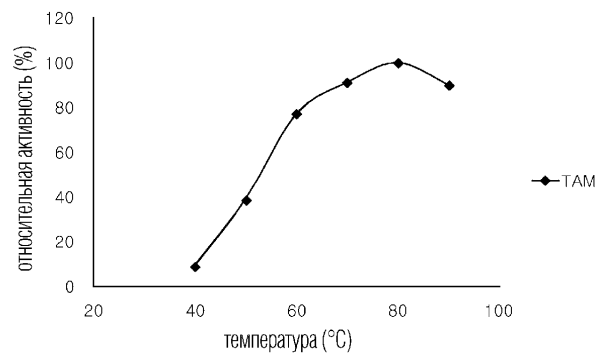


8/21

ФИГ. 3А

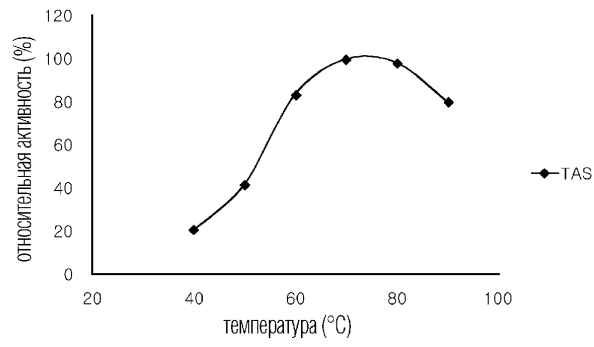


ФИГ. 3В

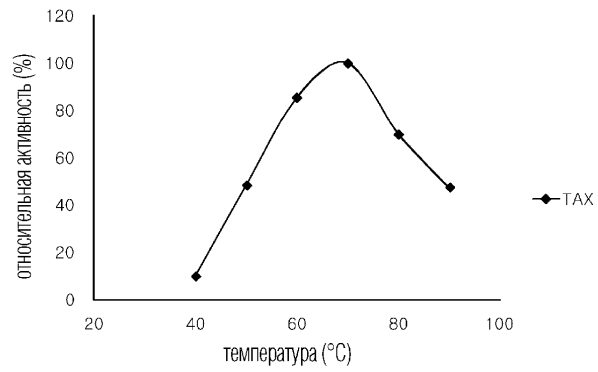


9/21

ФИГ. 3С

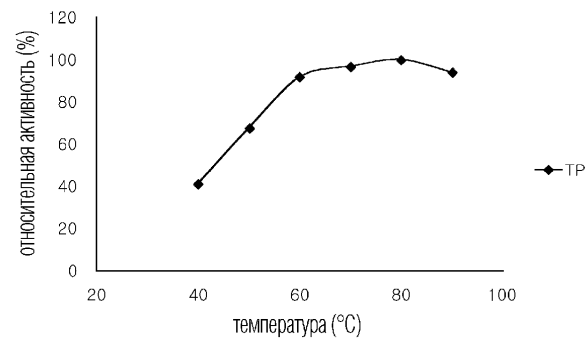


ФИГ. 3D

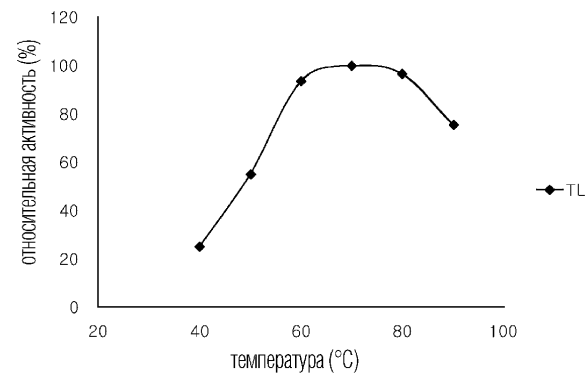


10/21

ФИГ. 3Е

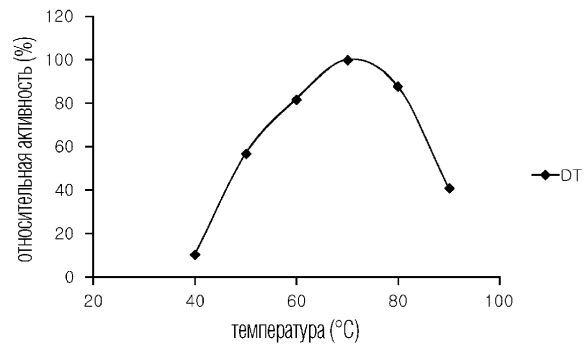


ФИГ. 3F

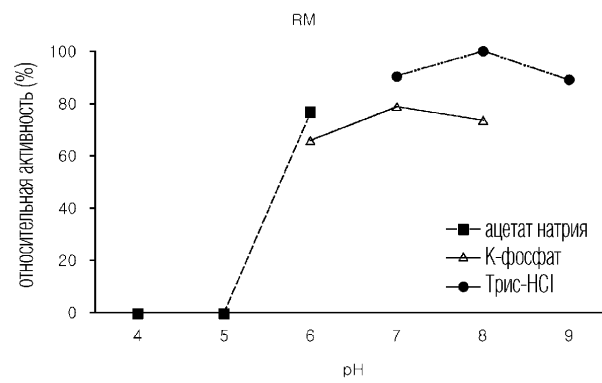


11/21

ФИГ. 3G

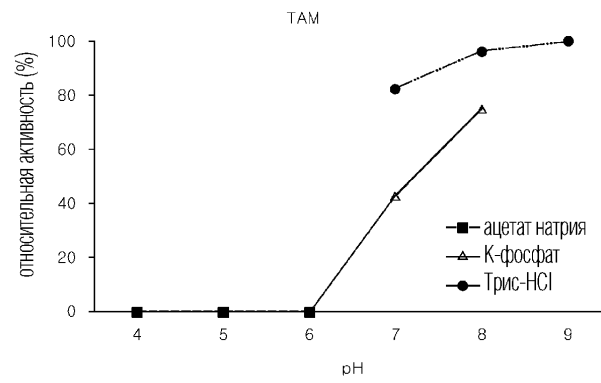


ФИГ. 4А

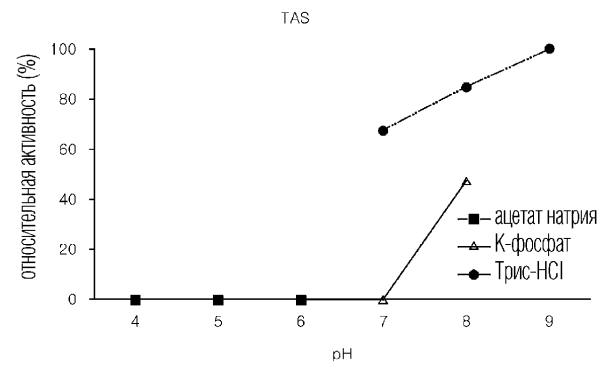


12/21

ФИГ. 4В

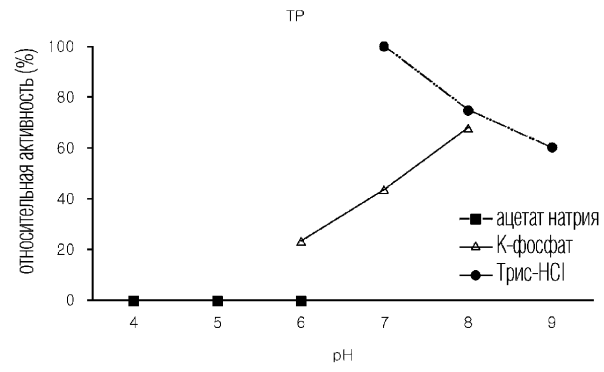


ФИГ. 4С

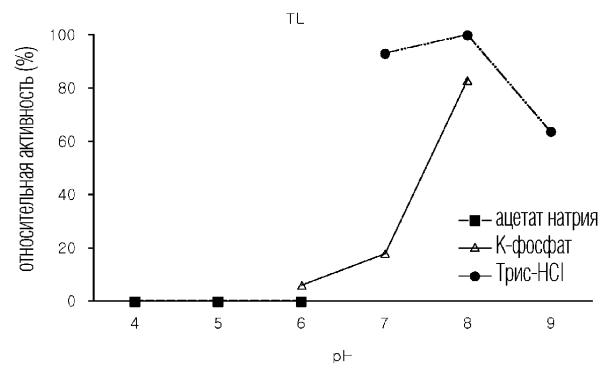


13/21

ФИГ. 4D

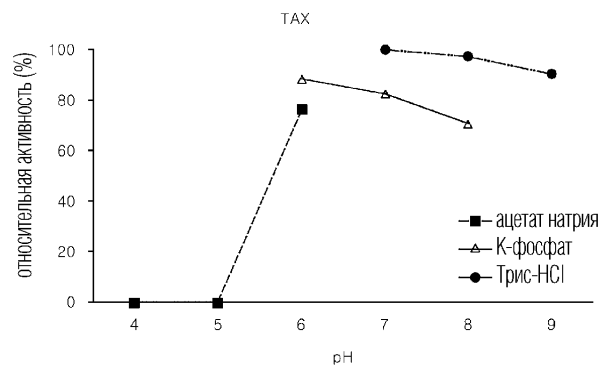


ФИГ. 4E

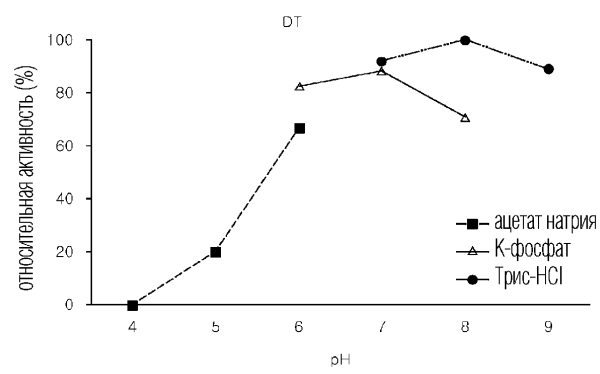


14/21

ФИГ. 4F

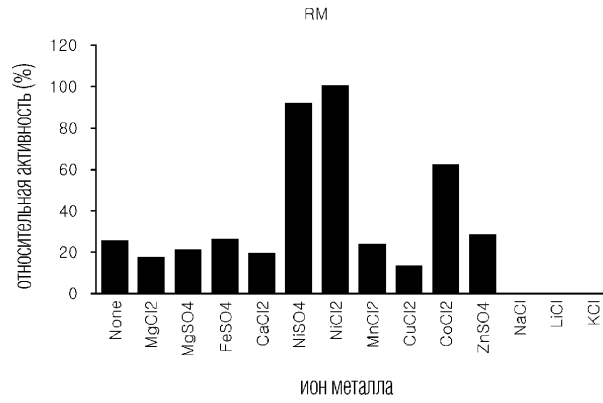


ФИГ. 4G

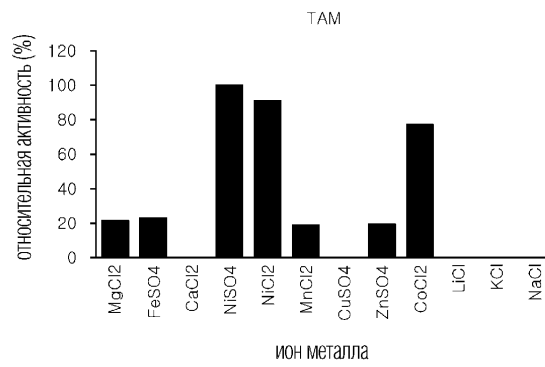


15/21

ФИГ. 5А

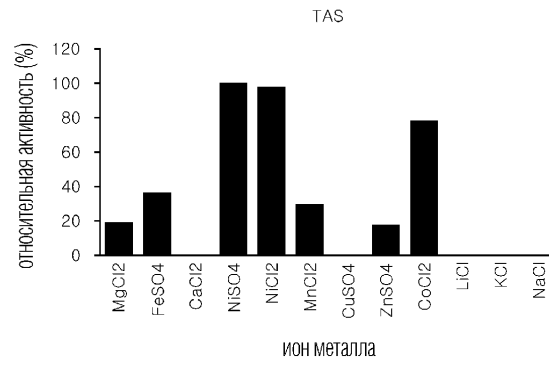


ФИГ. 5В

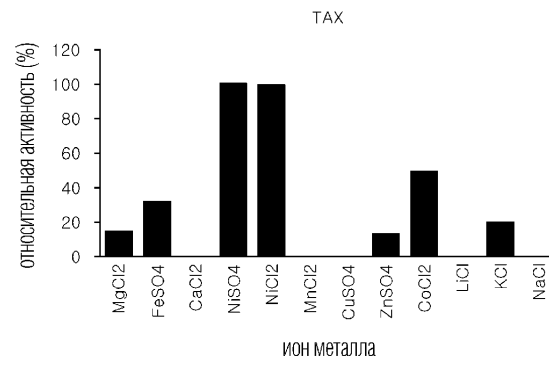


16/21

ФИГ. 5С

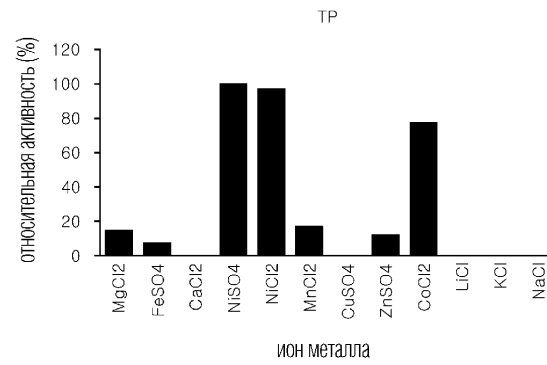


ФИГ. 5D

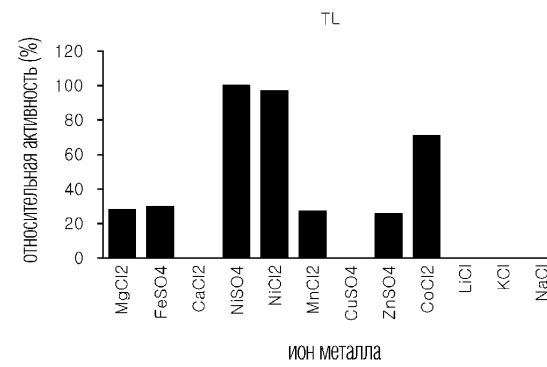


17/21

ФИГ. 5Е

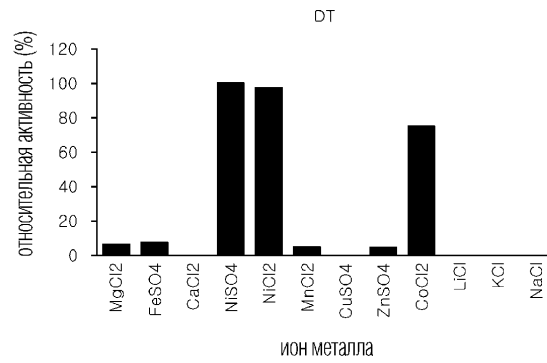


ФИГ. 5F



18/21

ФИГ. 5G



ФИГ. 6A

Аминокислотная последовательность белка, полученного из *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 T 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
    
```

19/21

ФИГ. 6BАминокислотная последовательность белка, полученного из *Thermotoga petrophila*

MVLKVFKDHFGRGYEVYEKSYREKDSLSEFFLTKGEEGKIL
 VVAGEKAPEGLSFFKKQRVGVSEFFFCERNHENLEVLKRY
 FFDLKPVRAGLRASFGTGDRLGITTPAHVRALKDSGLFPI
 FAQQSVRENERTGRTWRDVLDDATWGVFQEGYSEGFGA
 DADHVKRPEDLVSAAREGFT**M**FTIDPSDHVRNLSKLTEK
 ERNEKFEEILRKERIDRIYLGKKYSVLGEKIEFDEKNLRDA
 ALVYYDAIAHV**D****M**MYQILKDETPDFDFEVSVDDETETPTS
 PLFHIFVVEELRRRGVEFTNLALRFIGEWEEKGIDYKGDIA
 QFEREIK**M**HAEIAR**M**FEGYKISLHSGSDKFSVYPAFASAT
 GGLFHVKTAGTSYLEAVKVIS**M**VNPELFREIYRCALDHFEE
 EDRKSYHISADLSKVPEVEKVKDEDLPGLFEDINVRQLIH
 VTYGSLVKDASLKERLFKTLQNEELFYETVAKHIKRHVD
 LLKG

ФИГ. 6CАминокислотная последовательность белка, полученного из *Thermotoga lettingae*

MAENIVEKFEKLFKGGKYKIYYSSIRKLEKSFFF**M**IRDQKQK
 YLISIAKKRICEKFEGKKIGRINDLDIL**M**CPTNDYCNCKVIR
 TLFNINPSVCKKNTSFGFGDRLGLATPAHTTLINKYDVFP
 VLAQQSVRELSRTHRNFKDVLDLSDAIWGFESGYEGEFGA
 DADHVKDINDL**M**QAAYEGYS**M**YTVDPDHVKNIDKINQ
 GELVEFYKSHPLRKEIE**M**IYSGKVFSFEKSKFT**M**EDKELFR
 IFVTVYVDAIEHVVKCYEAIKNTKKNFDFEVSIDETS IPTSP
 LAHIFIVHELRRRGVDFQTLALRFVQWQKAIDYIGDLSV
 LESELS**M**HCEIVKSLSGYRLSLHSGSDKFSVYRIFTHYCD
 GKLVKTAGTSYLEAIRTVAEASPSLYRNIIHKYALTCFEK
 DNTSYHVTADINKIPVDNVEDSKVVNLLDIPVVRQLIHI
 TYGSLTEKINGKYLFRDEIYRILHENEFHLYKRIRDHLGK
 HLELLKN

20/21

ФИГ. 6DАминокислотная последовательность белка, полученного из *Thermoanaerobacter mathranii*

MV 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

ФИГ. 6EАминокислотная последовательность белка, полученного из *Dictyoglomus turgidum*

ML 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

21/21

ФИГ. 6FАминокислотная последовательность белка, полученного из *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*

MVGNVSSVLKESGFQIYPDSLRLKLGENTYIFVVKKQKEK
MIGILSNDELKLLKEPYFSENKKISDNLQFNVYSFTFDNYV
 TLNGRFHIGPTICRENASFGTGDRLGLATAAQLDALKKFN
 VFPILAQQSPRELVKTRDFKDVLLKVVLGVLETGYIGHY
 GADADHIKDEKYLLEGIDAGY**M**YTLDLSEQLFDVSGAT
 SLEIKEKAKTLDVSRKIVEDFSGKSLNVGFGGHLVSEDEL
 LKSAVAYEAA**M**KFVEKVNILKEKLNDFDLEISIDEGGKV
 TTLEDHLFVAEYLHRNGIDFFSIAPKFPGEFEKAIDYVGD
 VNEFERELKKHYDLTKLIGGYKLSLHSGSDKFSIYKIFSQT
 TEKNFHICTSGTSLQAVNLIYKSDKEFYRELYKIALSNLE
 ESKKSYKVLIKKDDFKDEPELDNSEFIIRPEIKQLFHISFGV
 LLDLKGKEIK**M**LYDYEEEHYK**M**VSDNIENHLKEIFYEK

ФИГ. 6GАминокислотная последовательность белка, полученного из *Thermoanaerobacter siderophilus*

MKEELSDYLLKNSFLLYPDSFRRLREDVYIFVAKKDSDKKI
 GLLTNGNFKLSSPHFAEDKYVEELGFYINLYPLTYENYLIL
 KDNFGISPVTCKEKA SFGTGDRLGLATPAHIKALKKNYNVF
 PVLAQQSPRELVKTHRDFKDVFLKVLGVLEAGYAGGYG
 ADADHIKDEKYLIEAIDAGY**M**YTLDLSDLLVKISD**M**PKS
 QLKEKAQSLSSQSREIIDRFKGGKFSISTDEDFAVSEDELY
 KSALTYEKA**M**KFVEKVYGIKDRLQHFDFLEISIDEGEKDT
 TVEDHIFVAEYLHRKGI DFWSLAPKFPGEFQKAIDYKGDJ
 KKFTSGLKKHYFLSKKLGGYKLSLHSGSDKFSIYKIFNEIT
 EGNFHICTSGTSLQAINIIFERDKDLFNDLYKIALDNLEE
 SKKAYKVLIDRDDFPQTIQTEDSQILLKPEIKQLFHISYGV
 LLDERRKEIYEVLNKYE EHYEFVSKNIENHLKEIFNI