

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 982**

51 Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2007** **E 07833921 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013** **EP 2087108**

54 Título: **Isomerasa de arabinosa expresada en el género Corynebacterium y procedimiento de elaboración de tagatosa mediante su uso**

30 Prioridad:

27.11.2006 KR 20060117795

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

21.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 438 982 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

Isomerasa de arabinosa expresada en el género *Corynebacterium* y procedimiento de elaboración de tagatosa mediante su uso

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un gen de la isomerasa de arabinosa expresado en una cepa del género *Corynebacterium* y a un procedimiento para la preparación de tagatosa mediante su uso, y más particularmente, la presente invención proporciona un gen que codifica para la isomerasa de arabinosa, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3, procedente de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, un vector de expresión recombinante preparado mediante la inserción del gen en el vector lanzadera pCJ-1 KCCM 10611P o pCJ-7 KCCM 10617P, un procedimiento de preparación de una isomerasa de arabinosa termófila mediante la expresión del gen en una cepa del género *Corynebacterium* de calidad alimentaria GRAS transfectada con el vector de expresión recombinante, y un procedimiento de preparación de tagatosa a partir de galactosa usando el mismo.

Antecedentes de la técnica

Con el creciente interés en el bienestar o en una vida saludable, se ha propuesto la tagatosa como una alternativa al azúcar ya que tiene menos efectos secundarios y el azúcar es uno de los principales factores que provocan diversas enfermedades en adultos. La tagatosa es el isómero de la galactosa y es conocido por tener unas propiedades fisicoquímicas similares a las de la fructosa. La tagatosa es un azúcar natural bajo en calorías, y recientemente ha sido aprobado por la FDA de EE.UU. como una sustancia GRAS (*Generally Recognized As Safe* [generalmente reconocida como segura]), por lo que ahora está permitida su adición como edulcorante en comidas, bebidas, comidas saludables, aditivos de dietas, etc.

GRAS indica una sustancia que es generalmente reconocida como segura, lo que es juzgado por personas especializadas con una experiencia y una capacidad suficientes mediante procedimientos científicos y el examen en las condiciones indicadas y el propósito de uso. GRAS es un sistema único usado únicamente en los EE.UU. para evaluar la seguridad de los alimentos y de las sustancias químicas alimentarias (en ciertas condiciones) pero es reconocido mundialmente.

La tagatosa se produce bien mediante isomerización, que es un procedimiento químico que usa un catalizador para producir un isómero de galactosa, o bien mediante un procedimiento biológico que usa la isomerasa para convertir enzimáticamente la galactosa.

Uno de los procedimientos biológicos bien conocidos por los expertos en la técnica es convertir aldosa o derivados de aldosa en cetosa o derivados de cetosa mediante el uso de una enzima. La isomerización de galactosa en tagatosa mediante el uso de la isomerasa de arabinosa se lleva a cabo generalmente termodinámicamente y a una elevada temperatura, y muestra una tasa de conversión proporcionalmente alta. Por lo tanto, el desarrollo de una enzima que trabaje de forma estable a elevadas temperaturas y de un procedimiento para preparar tagatosa usando la misma son técnicas clave para la aplicación industrial de la misma basada en la conversión biológica de la tagatosa usando una isomerasa. Mediante el cribado de isomerases de arabinosa derivadas de bacterias termófilas, se ha ensayado una isomerasa termófila aplicable industrialmente, y también han realizado esfuerzos muchos equipos de investigación para establecer un proceso de isomerización que usa la misma.

En Corea, se ha desarrollado un procedimiento de isomerización enzimática que usa una isomerasa de arabinosa por parte de Tong Yang Confectionery Corp. Según el procedimiento, la isomerasa de arabinosa derivada de *E. coli* se expresó homogéneamente en *E. coli* mediante tecnología recombinante. Esta isomerasa recombinante se hizo reaccionar a 30 °C durante 24 horas para convertir la galactosa en tagatosa, y en ese momento la tasa de conversión era del 25 %, lo que indicaba que tanto la termoestabilidad como el rendimiento de conversión eran muy bajos (solicitud de patente coreana N° 99-16118). El profesor Oh, Deok-keun y sus colegas (universidad de Sejong) tuvieron éxito en la expresión heterogénea de la isomerasa de arabinosa procedente de *Geobacillus stearothermophilus* en *E. coli* y basándose en eso propusieron un procedimiento de isomerización a elevada temperatura para convertir la galactosa en tagatosa. Los presentes inventores tuvieron éxito en la clonación de un nuevo gen de isomerasa de arabinosa de *Thermotoga neapolitana* y en su producción en *E. coli*, y desarrollaron adicionalmente un procedimiento de elaboración de tagatosa en un estado hipertermófilo usando la enzima (patente coreana N° 10-0443865).

El documento WO02/052021 se refiere a un gen que codifica la L-isomerasa de arabinosa derivada de *Thermotoga neapolitana* 5068, a una isomerasa de arabinosa termoestable expresada por dicho gen, a un proceso para preparar dicha isomerasa de arabinosa y a un proceso para preparar D-tagatosa empleando dicha isomerasa de arabinosa.

La producción de tagatosa usando una isomerasa de arabinosa derivada de termófilos aún depende del procedimiento de usar una enzima recombinante expresada en masa en *E. coli* recombinante o de la isomerización

de galactosa en tagatosa usando un hospedador que contiene la enzima recombinante. Sin embargo, esta producción biológica de tagatosa usando *E. coli* recombinante no es apropiada para la producción de tagatosa como ingrediente alimentario. Para producir tagatosa como aditivo alimentario, es esencial que la isomerasa de arabinosa sea expresada en un hospedador que sea un microorganismo GRAS apropiado para la producción en masa de la misma.

Corynebacterium es un microorganismo industrial que se ha usado para la producción de compuestos químicos aplicables a varios ámbitos incluyendo L-lisina, L-treonina y varios alimentos que contienen ácidos nucleicos, suministros médicos y alimentos. La cepa *Corynebacterium* es una cepa GRAS (generalmente reconocida como segura), que favorece la manipulación génica y la producción en masa. Además, esta cepa es muy estable en las diversas condiciones del proceso y tiene una membrana celular comparativamente estable, en comparación con otras bacterias. Por lo tanto, esta cepa permanece estable incluso bajo la elevada presión osmótica generada por una elevada concentración de galactosa.

15 Srivastava P y Deb JK revisan sistemas de expresión génica en corinebacterias, incluyendo plásmidos corinebacterianos y elementos reguladores, y el desarrollo de vectores para la clonación y la expresión génica (Srivastava P y Deb JK (2005) Gene expression systems in corynebacteria. *Protein Expression and Purification* 40: 221 - 229).

20 Los presentes inventores averiguaron que la isomerasa de arabinosa termófila procedente de la *Thermotoga neapolitana* hipertermófila es sobreexpresada en una forma activa en una cepa del género GRAS de *Corynebacterium*, y adicionalmente completaron la invención según las reivindicaciones 1 - 3 mediante el desarrollo de una nueva técnica para inducir la isomerización de la tagatosa a partir de una elevada concentración de galactosa mediante el uso de enzimas recombinantes expresadas en especies de *Corynebacterium*.

25 Desvelación de la invención

Problema técnico

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para preparar cepas GRAS que expresan la isomerasa de arabinosa de forma estable en sus células en las condiciones de elevada temperatura y elevada concentración de galactosa aprovechando la producción en masa de la enzima recombinante en la cepa del género *Corynebacterium*.

35 Solución técnica

Para superar los límites del procedimiento convencional, en el que una enzima sólo podría ser expresada en *E. coli*, es también un objeto de la presente solicitud proporcionar un procedimiento para preparar tagatosa en el que se expresa la isomerasa de arabinosa procedente de *Thermotoga* en una forma activa en una cepa GRAS de *Corynebacterium*, y consecuentemente se genera tagatosa de calidad alimentaria a partir de galactosa usando la enzima recombinante expresada u hospedadores que la contienen.

El anterior objeto y otros objetos de la presente solicitud pueden conseguirse mediante las siguientes formas de realización de la presente invención.

45 En lo sucesivo se describe la presente invención con detalle.

La presente invención proporciona un procedimiento según la reivindicación 1 para producir una enzima recombinante mediante la introducción del gen de la isomerasa de arabinosa a partir de un microorganismo que es muy difícil de obtener a partir de un cultivo celular directo, porque las condiciones de crecimiento óptimas para el microorganismo son al menos 80 °C o son condiciones anaerobias, en un hospedador de calidad alimentaria.

La isomerasa de arabinosa puede proceder preferiblemente de una cepa de *Thermotoga*, *Thermus* o *Sulforobus* cuya temperatura de reacción óptima esté en el intervalo de 70 – 90 °C.

55 El gen de la isomerasa de arabinosa procede de la hipertermófila *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 3.

El gen de la isomerasa de arabinosa puede ser modificado por los expertos en la técnica usando cualquier procedimiento convencional de mutagénesis, tal como la evolución dirigida y mutagénesis dirigida. Por lo tanto, cualquier célula hospedadora que tenga un cierto nivel de homología con un hospedador GRAS, por ejemplo una homología de al menos el 70 % pero preferiblemente de al menos el 80 % y más preferiblemente de al menos el 90 % con un hospedador GRAS, y una enzima recombinante que sea expresada en una forma activa en el hospedador, y cualquier célula hospedadora que contenga la enzima, están todos incluidos en los criterios de la presente solicitud.

La presente solicitud también desvela un vector que contiene un gen que codifica para la isomerasa de arabinosa. El vector de la presente solicitud es un vector típico para la clonación o la expresión génica.

5 En la presente invención se usó un promotor que es activo en *Corynebacterium* como el vector para expresar una isomerasa termófila en una forma activa. La secuencia promotora usada para la expresión génica en *Corynebacterium* no ha sido identificada, a diferencia de otros promotores usados en microorganismos industriales tales como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. En este documento se ha desarrollado un fuerte promotor que se origina en *Corynebacterium*, un popular microorganismo industrial, y que puede ser expresado en *E. coli*. El promotor Tac se
10 conoce por ser uno de los promotores más fuertes. El promotor Tac se prepara mediante la fusión de una secuencia de la región -35 del promotor del operón de triptófano de *E. coli* con una secuencia de la región -10 del promotor del operón de lactosa de *E. coli*. Se confirmó que el promotor formado por CJ-1 ~ CJ-7 de la presente invención era más eficaz para expresar un gen objetivo en células bacterianas del género *Corynebacterium* que el promotor tac (publicación de patente coreana N° 10-2006-0068505).

15 El promotor de *Corynebacterium* muestra una actividad promotora no sólo en microorganismos del género *Corynebacterium*, sino también en bacterias del género *Escherichia* y en células de *E. coli*. En particular, el promotor muestra una actividad de promotor en células bacterianas del género *Escherichia* al menos dos veces mayor de lo que lo hace el promotor tac.

20 La cepa de calidad alimentaria, es decir, una cepa GRAS, incluye *Corynebacterium*, y más específicamente *Corynebacterium glutamicum* KCTC 10302.

Según una forma de realización de la presente solicitud, se preparó una cepa recombinante mediante la transformación de *Corynebacterium* con el vector, que después se cultivó para proporcionar una isomerasa de arabinosa de calidad alimentaria. El medio de cultivo y las condiciones dependían del tipo de hospedador.

La presente solicitud proporciona una isomerasa de arabinosa recombinante y un procedimiento para la preparación de tagatosa a partir de galactosa mediante la inmovilización de células hospedadoras que contienen la enzima recombinante.

Breve descripción de los dibujos

La aplicación de las formas de realización preferidas de la presente invención se comprende mejor mediante referencia a los dibujos anexos, en los que:

la Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra la construcción de los vectores de expresión recombinantes pCJ-1-TNAI y pCJ-7-TNAI que contienen un gen que codifica para la isomerasa de arabinosa termófila procedente de la cepa *Thermotoga neapolitana* DSM 5068,

la Fig. 2 es una gráfica que ilustra el crecimiento del cultivo dependiente del tiempo de la cepa recombinante de *Corynebacterium*. Particularmente, se cultivó *Corynebacterium* recombinante en un medio óptimo a 30 °C durante 24 horas.

la Fig. 3 es una fotografía que ilustra los resultados de una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) de los patrones de expresión de proteínas totales observados en disoluciones enzimáticas en bruto de cada etapa de separación y purificación de la isomerasa de arabinosa expresada en *Corynebacterium* recombinante. Cada banda proteica indica lo siguiente:

M: marcador proteico de amplio alcance (Bio-Rad, EE.UU.)

1: disolución enzimática en bruto

2: sobrenadante enzimático tratado térmicamente

3. Fragmento enzimático después de la cromatografía de intercambio aniónico (columna HiTrap Q, GE Healthcare, EE.UU.)

4. Fragmento enzimático purificado tras la cromatografía de exclusión por tamaños (columna Superdex 200 pg, GE Healthcare, EE.UU.)

La Fig. 4 es una gráfica que ilustra la cantidad de la isomerasa de arabinosa. La *Corynebacterium* recombinante y la *E. coli* que contiene la isomerasa de arabinosa expresada en una forma activa se hicieron reaccionar en PBS (disolución salina tamponada con fosfato) que contenía diferentes concentraciones de galactosa de 0, 10, 20, 30 y 40 % durante 2 horas a elevada temperatura (70 °C) con agitación, y después se midió el nivel de expresión

enzimática en el tampón.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 5 Las formas de realización prácticas y actualmente preferidas de la presente invención se ilustran según se muestra los siguientes ejemplos.

[Ejemplos]

- 10 En la forma de realización preferida de la presente invención se insertó un gen que codifica para la isomerasa de arabinosa termófila procedente de la *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 hipotermófila en pCJ-1 y pCJ-7 (vectores lanzadera *E. coli-Corynebacterium*, publicación de patente coreana N° 10-2006-0068505). Se transfectó *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 con los vectores anteriores, en la que finalmente se sobreexpresó dicha proteína. Las cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum* CJ-1-TNAI (KCCM10786P) y CJ-7-TNAI
15 (KCCM10787P) se cultivaron y se obtuvieron extractos celulares a partir de cada etapa del cultivo celular. Se midió la actividad de producción de tagatosa, esto es, se midió la cantidad de proteína recombinante activa etapa por etapa. Se separó del cultivo resultante expresado óptimamente y se purificó mediante lisis celular, tratamiento térmico, resina de intercambio iónico y cromatografía en gel. Finalmente se examinó la secuencia de aminoácidos del amino terminal y se confirmó la actividad de producción de tagatosa mediante la medición de la actividad
20 proteica.

Ejemplo 1: clonación de la isomerasa de arabinosa

- Se cultivó *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 en condiciones anaerobias. Se realizó una centrifugación a 8.000 x g
25 durante 10 minutos para recuperar las células cultivadas. Se extrajo el ADN genómico de las células obtenidas mediante el uso de un kit Cell culture DNA Midi (Qiagen, EE.UU.). Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el ADN genómico mediante el uso de los oligonucleótidos 5'-CCCGA TATCATGATCGATCT-' CAAACAGTATGAG-3' (SEC. ID. N° 1) y 5'-TGCACTGCAGTCATCT TTT-TAAAAGTCCCC-3' (SEC. ID. N° 2) con la excepción de las secuencias de los sitios enzimáticos de restricción EcoRV y PstI como cebadores. El producto de la
30 PCR se obtuvo mediante la amplificación del ADN de 1509 pb que contenía el gen de la isomerasa de arabinosa de *Thermotoga neapolitana*. Para producir en masa la isomerasa de arabinosa codificada por el gen amplificado se seleccionaron los vectores derivados del género *Corynebacterium* que mostraban una excelente capacidad de sobreexpresión de la proteína. Los vectores se introdujeron en *E. coli* DH5alpha, que fueron depositadas en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), una autoridad depositaria internacional (IDA), el 6 de noviembre
35 de 2004 (números de acceso: KCCM-10611 y KCCM-10617) (Tabla 1).

Tabla 1

[Tabla 1]

40

Promotor	Vector	Número de acceso	Proteína derivada
pCJ1	pECCG117	KCCM-10611	Proteína de choque térmico hsp60
pCJ7	pECCG117	KCCM-10617	Dismutasa de superóxido de manganeso

- El producto de la PCR digerido con las enzimas de restricción EcoRV y PstI se insertó en los vectores lanzadera pCJ-1 y pCJ-7, que fueron digeridos con las mismas enzimas, dando lugar a la construcción de los vectores de
45 expresión recombinantes pCJ-1-TNAI y pGJ-7-TNAI (véase la Fig. 1). Se transfectó *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 con los vectores de expresión recombinantes pCJ-1-TNAI y pCJ-7-TNAI para preparar cepas recombinantes, que se denominaron *Corynebacterium glutamicum* CJ-1-TNAI y *Corynebacterium glutamicum* CJ-7-TNAI. Las cepas recombinantes se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), una autoridad depositaria internacional (IDA), ubicada en #361-221, Hongje I-Dong, Seodaemun-Gu, Seúl, Corea, el 18
50 de octubre de 2006 (números de acceso: KCCM 10786P y KCCM 10787P).

Ejemplo 2: expresión de la isomerasa de arabinosa en *Corynebacterium*

- Se inocularon las cepas recombinantes *Corynebacterium glutamicum* CJ-1-TNAI y *Corynebacterium glutamicum* CJ-
55 7-TNAI (números de acceso: KCCM10786P y KCCM10787P) preparadas en el Ejemplo 1 en medio MB (Bacto-trypton 10 g/l, extracto de Bacto-yeast 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 5 g/l) que contenía 10 µg/ml de canamicina a la concentración de DO₆₀₀ = 0,1, seguido de un cultivo a 30 °C durante 24 horas para inducir la expresión de la isomerasa de arabinosa recombinante. Para medir la actividad enzimática de la isomerasa de arabinosa expresada, se centrifugó la disolución del cultivo a 8.000 x g durante 10 min y se recuperaron las células. Las células se
60 resuspendieron en tampón Tris-HCl (pH 7,0) 50 mM, seguido de la aplicación de ultrasonidos para lisar las células. Se obtuvo el sobrenadante como una disolución enzimática en bruto, con la que se realizó la isomerización de la

galactosa. Particularmente, para la isomerización se mezclaron 100 μ l de una disolución enzimática que contenía 40 mM de galactosa como sustrato con 1 ml de un tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0). En ese momento se añadieron a la mezcla de reacción 5 mM de $MnCl_2$ y 1 mM de $CoCl_2$. La mezcla de reacción enzimática en bruto se hizo reaccionar a 60 °C durante 20 minutos. Se midió la actividad de la enzima en bruto mediante el método de

5 cisteína-carbazol-ácido sulfúrico (Dische, Z., y E. Borenfreund., A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses, *J. Biol. Chem.*, 192: 583 - 587, 1951). El contenido proteico en la disolución enzimática en bruto se cuantificó con un kit de ensayo Bradford (Biorad, EE.UU.). Como resultado, la actividad de isomerasa era de 2,050 (mg de tagatosa/mg de proteína·h), lo que indicaba que se había generado con

10 éxito el producto de la isomerización de la galactosa, la tagatosa.

Ejemplo 3: optimización de las condiciones de cultivo para la producción en masa de la cepa de recombinante

Se inocularon las cepas recombinantes preparadas en el Ejemplo 2 en medio MB (Bacto-trypton 10 g/l, extracto de

15 Bacto-yeast 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 5 g/l) que contenía 10 μ g/ml de canamicina a la concentración primaria de $DO_{600} = 0,6$. Se investigó el crecimiento de las cepas en los medios básicos para el cultivo de *Corynebacterium*, medio MB (Bacto-trypton 10 g/l, extracto de Bacto-yeast 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 5 g/l) y un medio modificado (Bacto-peptone 10 g/l, extracto de Bacto-yeast 5 g/l, NaCl 2,5 g/l, extracto de vaca 5 g/l). Se compararon los crecimientos dependientes de la temperatura (25 °C, 30 °C, 37 °C), dependientes del pH y dependientes de la

20 concentración de glucosa (fuente de carbono) y de sacarosa en los dos medios. Además se midieron así los crecimientos en las diversas condiciones y niveles de expresión de la enzima cada hora para juzgar las condiciones óptimas de expresión para la producción en masa de la isomerasa de arabinosa recombinante (Tablas 2 y 3).

Tabla 2

[Tabla 2]

	Medio modificado	medio MB				
	Aeróbico	Aeróbico	Estacionario	25 °C	30 °C	37 °C
DO_{600}	10,1	9,4	5,56	8,88	10,1	4,44
pH	7,5	7,6	7,8	7,4	7,5	7,5
Actividad (mU/ml)	60,907	56,09	34,2	58,783	60,907	29,054

30 Tabla 3

[Tabla 3]

	0 %	Sacarosa				Glucosa			
		2,5 %	5 %	7,5 %	10 %	2,5 %	5 %	7,5 %	10 %
DO_{600}	10,1	13,6	12,72	14,86	12,94	14,7	14,32	10,96	4,36
pH	7,5	4,5	4,7	4,7	4,7	4,5	4,5	4,7	4,7
Actividad (mU/ml)	60,907	85,088	82,160	79,104	73,708	67,935	58,896	58,649	42,441

35

Para medir la actividad enzimática de la isomerasa de arabinosa recombinante, la enzima se trató y se cuantificó de la misma forma a la descrita en el Ejemplo 2. Cuando las células se cultivaron a 30 °C en condiciones aeróbicas con la adición de un 2,5 % de sacarosa, la tagatosa, el producto de la isomerización de la galactosa, mostró

40 aproximadamente 85,1 mU/ml de actividad enzimática, lo que es 1,4 veces mayor que la observada en el cultivo estándar (60,9 mU/ml), lo que sugiere que la actividad enzimática aumentó al aumentar el crecimiento de las células. Los resultados del crecimiento celular en el medio óptimo se muestran en la Fig. 2.

Ejemplo 4: separación y purificación de la isomerasa de arabinosa recombinante y confirmación de la expresión de la proteína activa mediante la secuenciación de los aminoácidos N terminales

45

Se elaboraron 2 l de cultivo de la cepa recombinante en las condiciones óptimas de cultivo determinadas en el anterior Ejemplo 3. La disolución de cultivo se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos y se recuperaron las células. Las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), y se usaron para la purificación proteica. La suspensión celular progresó hacia la lisis celular usando un homogeneizador celular a alta presión de la serie T

(4,0 kW; Constant systems, Reino Unido), seguido de un tratamiento térmico a 80 °C durante 20 min. La centrifugación se realizó a 10.000 x g durante 10 minutos para separar la isomerasa de arabinosa termófila recombinante expresada. La disolución de enzima recombinante separada se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico (Hiprep Q 16/10, Amersham Bioscience, EE.UU.), ultrafiltración (Centriprep 30, Amicon, Alemania) y cromatografía de exclusión por tamaños; Superdex 200pg, Amersham Bioscience, EE.UU.) (Tabla 4). La composición proteica de la disolución enzimática de cada etapa se analizó mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) (Fig. 3).

Tabla 4

10

[Tabla 4]

Etapa de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (AU)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Disolución enzimática en bruto	665	410,4	1,0	100
Tratamiento térmico	480	364,3	1,2	89
Cromatografía de intercambio iónico	63,5	201,5	5,1	49
Cromatografía en gel	28,1	136,3	7,7	33

La proteína recombinante separada y purificada fue finalmente identificada mediante la secuenciación de los aminoácidos N terminales. La proteína purificada mediante cromatografía en gel se analizó mediante SDS-PAGE y como resultado se confirmó que la proteína tenía un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, que era el mismo peso molecular que la isomerasa de arabinosa de *Thermotoga neapolitana*. La banda proteica se transfirió a una membrana de PVDF para una investigación adicional por parte del Korean Basic Science Institute. Como resultado, se identificaron los 10 aminoácidos del amino terminal de la proteína recombinante separada como 'Met-Ile-Asp-Leu-Lys-Gln-Tyr-Glu-Phe-Trp', que era la secuencia de la secuencia de proteínas N terminal de la isomerasa de arabinosa de *Thermotoga neapolitana*. Por lo tanto, se confirmó que esta secuencia era la misma que la secuencia de aminoácidos de la isomerasa de arabinosa originada a partir de *Thermotoga neapolitana* (SEC. ID. N° 3).

15 **Ejemplo 5: estabilidad de reacción de la cepa recombinante para la expresión enzimática a elevada temperatura y elevada concentración**

Corynebacterium es una cepa muy estable en diversas condiciones de producción y tiene una membrana celular comparativamente dura, por lo tanto permanece estable incluso en las condiciones altamente osmóticas provocadas por una elevada concentración de sacarosa. Estas características de la cepa favorecen la mejora de la estabilidad de reacción con una elevada concentración de un sustrato. Por lo tanto, aprovechando dichas características, los presentes inventores expresaron la isomerasa de arabinosa hipertermófila en *Corynebacterium*.

La cepa recombinante de *Corynebacterium* cultivada en un medio preparado en el Ejemplo 3 y la cepa recombinante de *E. coli* cultivada en medio LB (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de Bacto-trypton, 10 g/l de cloruro sódico) se centrifugaron respectivamente a 8.000 x g durante 10 minutos para obtener las células. Las células se resuspendieron en PBS (disolución salina tamponada con fosfato) para experimentos adicionales. Para comparar la estabilidad de la cepa con una elevada concentración de sustrato, se añadió galactosa al 0, 10, 20, 30 y 40 % a la disolución, seguido de una reacción con agitación a 70 °C durante 0, 1 y 2 horas. Para cuantificar la proteína expresada en las células de cada producto de reacción, se realizó una centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Después, las proteínas expresadas fueron cuantificadas mediante BCA (método de ensayo de proteínas del ácido bicínico). A partir de la comparación de la expresión proteica según la concentración de sustrato entre las células recombinantes de *E. coli* y las células recombinantes de *Corynebacterium*, se confirmó que el nivel de expresión proteica en *Corynebacterium* era significativamente menor en comparación con el del control de *E. coli*. En la *E. coli* recombinante, la concentración de la lactosa aumentó significativamente según progresaba la reacción, mientras que la expresión de la proteína en *Corynebacterium* aumentó aproximadamente un 20 % incluso después de partir con la mayor concentración de galactosa de este experimento, que era del 40 % (Fig. 4).

Los resultados anteriores indican que la elución de proteínas está notablemente reducida en las células bajo una elevada concentración de sustrato, en comparación con la de *E. coli*. Esto es, al contrario que el hospedador convencional de *E. coli*, un hospedador de *Corynebacterium* que contiene la enzima expresada en el mismo muestra una elución reducida de proteína intracelular bajo un elevado contenido en azúcar.

También se confirmó que el hospedador de *Corynebacterium* era muy estable en unas condiciones de reacción duras, incluyendo alta temperatura y alta concentración de sustrato, en comparación con el hospedador de *E. coli*. Esta estabilidad favorece el aumento de la estabilidad de reacción en un reactor celular inmovilizado, y por lo tanto da como resultado un aumento de la semivida del reactor celular inmovilizado.

Aplicabilidad industrial

- Como se explicó anteriormente, se observó la expresión estable de la isomerasa de arabinosa procedente de la *Thermotoga* hipertermófila en *Corynebacterium*, y por lo tanto se lleva a cabo de forma eficaz una reacción continua
- 5 inmovilizada en la forma de realización preferida de la presente invención mediante el uso de *Corynebacterium* que contenía la forma activa de la enzima. Para producir material alimentario biotécnico usando un microorganismo enzimático, un aditivo debe cumplir una calidad alimentaria GRAS. La isomerasa de arabinosa procedente de la *Thermotoga* de calidad alimentaria preparada mediante el procedimiento de la presente invención puede ser aplicada a una reacción continua de forma estable para aumentar la posibilidad de industrialización de la enzima.
- 10 Los expertos en la materia apreciarán que las concepciones y las formas de realización específicas desveladas en la anterior descripción pueden utilizarse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras formas de realización para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención.
- 15 <110> CJ Corporation
- <120> Isomerasa de arabinosa expresada en el género *Corynebacterium* y procedimiento de elaboración de tagatosa mediante su uso
- 20 <130> PA06-0312
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- 25 <210> 1
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> cebador 1
- <400> 1
- 35 cccgatatca tgatcgatct caaacagtat gag
- <210> 2
<211> 30
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> cebador 2
- 45 <400> 2
tgcactgcag tcattttt aaaagtcccc
- <210> 3
<211> 496
- 50 <212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*
- <400> 3

ES 2 438 982 T3

Met	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Phe	Trp	Phe	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	1	5	10	15
Tyr	Leu	Tyr	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys	Val	Glu	Gln	Gln	Ala	Ser	20	25	30	
Arg	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Asp	Pro	Ile	Phe	Pro	Ser	Lys	Ile	35	40	45	
Val	Leu	Lys	Pro	Val	Leu	Lys	Asn	Ser	Ala	Glu	Ile	Arg	Glu	Ile	Phe	50	55	60	
Glu	Lys	Ala	Asn	Ala	Glu	Pro	Lys	Cys	Ala	Gly	Val	Ile	Val	Trp	Met	65	70	75	80
His	Thr	Phe	Ser	Pro	Ser	Lys	Met	Trp	Ile	Arg	Gly	Leu	Ser	Ile	Asn	85	90	95	

ES 2 438 982 T3

Lys Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Tyr Asn Arg Glu Ile Pro
 100 105 110
 Trp Asp Thr Ile Asp Met Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
 115 120 125
 Gly Asp Arg Glu His Gly Phe Ile His Ala Arg Met Arg Leu Pro Arg
 130 135 140
 Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Arg Glu Val Arg Glu Lys Ile
 145 150 155 160
 Ala Lys Trp Met Arg Val Ala Cys Ala Ile Gln Asp Gly Arg Thr Gly
 165 170 175
 Gln Ile Val Arg Phe Gly Asp Asn Met Arg Glu Val Ala Ser Thr Glu
 180 185 190
 Asp Asp Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Leu Gly Trp Ser Ile Asn Thr
 195 200 205
 Trp Gly Val Gly Glu Leu Ala Glu Gly Val Lys Ala Val Pro Glu Asn
 210 215 220
 Glu Val Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Glu Arg Tyr Ile Met Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Ile Arg Glu Gln Ala Lys Met Glu
 245 250 255
 Ile Ala Leu Arg Glu Phe Leu Lys Glu Lys Asn Ala Ile Ala Phe Thr
 260 265 270
 Thr Thr Phe Glu Asp Leu His Asp Leu Pro Gln Leu Pro Gly Leu Ala
 275 280 285
 Val Gln Arg Leu Met Glu Glu Gly Tyr Gly Phe Gly Ala Glu Gly Asp
 290 295 300
 Trp Lys Ala Ala Gly Leu Val Arg Ala Leu Lys Val Met Gly Ala Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Gly Gly Thr Ser Phe Met Glu Asp Tyr Thr Tyr His Leu Thr
 325 330 335
 Pro Gly Asn Glu Leu Val Leu Gly Ala His Met Leu Glu Val Cys Pro
 340 345 350
 Thr Ile Ala Lys Glu Lys Pro Arg Ile Glu Val His Pro Leu Ser Ile
 355 360 365
 Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ala Arg Leu Val Phe Asp Gly Gln Glu Gly
 370 375 380
 Pro Ala Val Asn Ala Ser Ile Val Asp Met Gly Asn Arg Phe Arg Leu
 385 390 395 400
 Val Val Asn Arg Val Leu Ser Val Pro Ile Glu Arg Lys Met Pro Lys
 405 410 415
 Leu Pro Thr Ala Arg Val Leu Trp Lys Pro Leu Pro Asp Phe Lys Arg

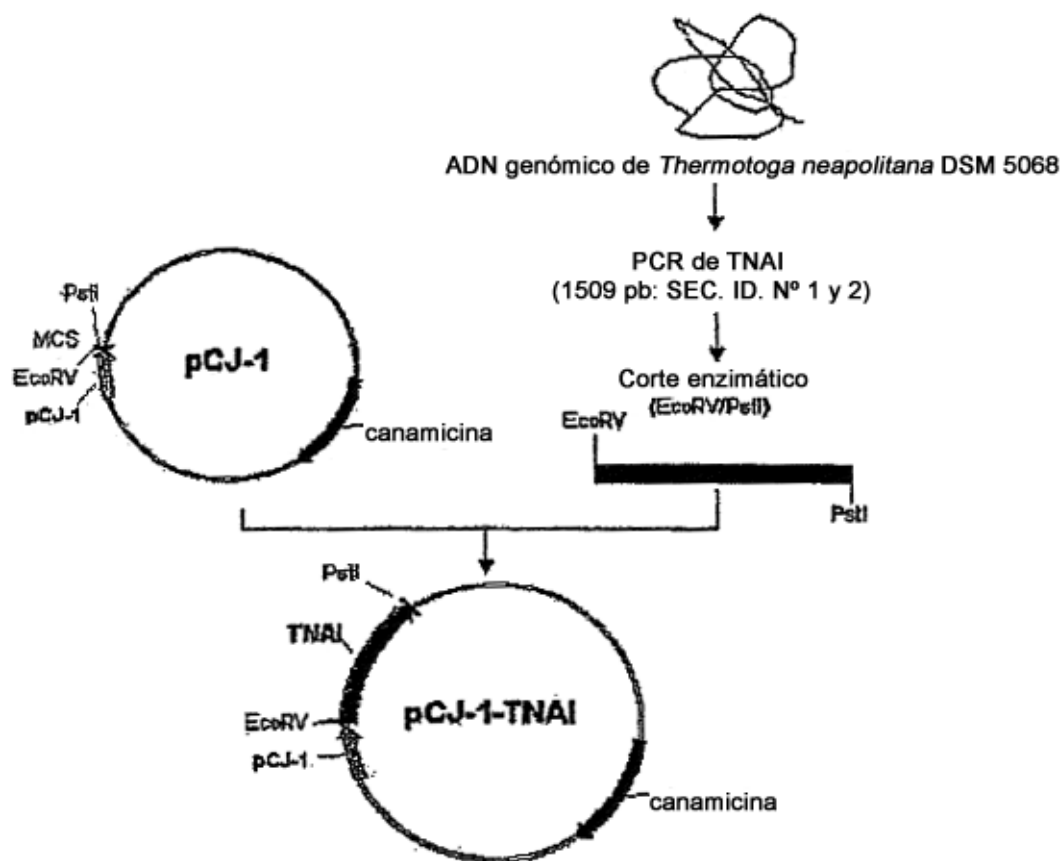
ES 2 438 982 T3

	420		425		430
Ala Thr Thr Ala Trp Ile Leu Ala Gly Gly Ser His His Thr Ala Phe					
	435		440		445
Ser Thr Ala Val Asp Val Glu Tyr Leu Ile Asp Trp Ala Glu Ala Leu					
	450		455		460
Glu Ile Glu Tyr Leu Val Ile Asp Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asn Phe					
465		470		475	480
Lys Lys Glu Leu Arg Trp Asn Glu Leu Tyr Trp Gly Leu Leu Lys Arg					
	485		490		495

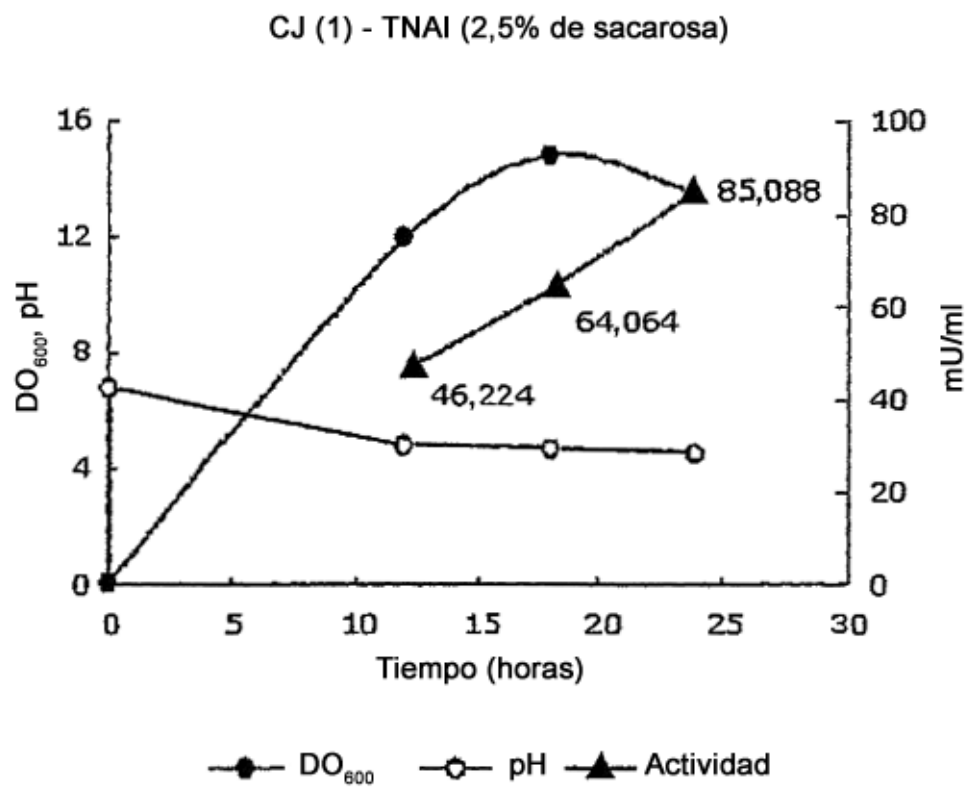
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una isomerasa de arabinosa que comprende:
 - 5 preparar un vector recombinante mediante la inserción de un gen que codifica para una isomerasa de arabinosa termófila, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N°: 3 procedente de la *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, en el vector lanzadera pCJ-1 KCCM 10611 o pCJ-7 KCCM 10617;
 - transfectar una cepa del género *Corynebacterium* con el vector recombinante, y
 - 10 producir la isomerasa de arabinosa mediante el cultivo de la cepa del género *Corynebacterium*.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa es *Corynebacterium glutamicum* CJ-1-TNAI KCCM 10786P.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa es *Corynebacterium glutamicum* CJ-7-TNAI KCCM 10787P.

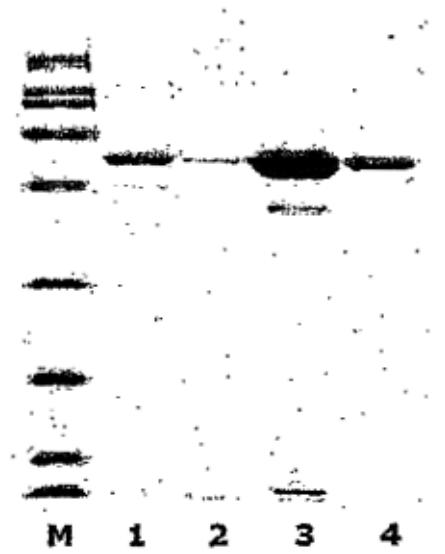
[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]

