

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 891**

51 Int. Cl.:

C12P 19/20 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2010 PCT/KR2010/005902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO2011040708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010 E 10820781 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2470668**

54 Título: **Inmovilización de psicosa-epimerasa y método para producir D-psicosa utilizando la misma**

30 Prioridad:

30.09.2009 KR 20090092784

02.12.2009 KR 20090118465

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

02.06.2017

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)

330, Dongho-ro, Jung-gu

Seoul, KR

72 Inventor/es:

HONG, YOUNG HO;

KIM, JIN HA;

KIM, SUNG BO;

KIM, JUNG HOON;

LEE, YOUNG MI y

PARK, SEUNG WON

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 614 891 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

Inmovilización de psicosa-epimerasa y método para producir D-psicosa utilizando la misma

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir sucesivamente D-psicosa a partir de D-fructosa o D-glucosa utilizando una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* expresada en una forma segura para la alimentación.

Antecedentes Técnicos

- 10 La D-psicosa ha sido muy utilizada como edulcorante funcional, con un sabor dulce similar al del azúcar, pero que es un azúcar monosacárido de energía ultrabaja. En particular, la D-psicosa es conocida como "azúcar rara", ya que es muy poco común en la naturaleza y, cuando se encuentra, sólo es en cantidades pequeñas.

- 15 La D-psicosa es un epímero de D-fructosa y la intensidad y tipo de dulzor son bastante similares a los de la D-fructosa. Sin embargo, al contrario que la D-fructosa, dado que la D-psicosa raramente se metaboliza cuando es absorbida en el cuerpo, prácticamente tiene cero calorías. Además, gracias a su acción de mitigación de la obesidad abdominal mediante la supresión de actividades enzimáticas relativas con la síntesis de lípidos, la D-psicosa puede emplearse como ingrediente efectivo en los alimentos de dieta. Por otro lado, mientras que los alcoholes de azúcar, muy utilizados como sucedáneos del azúcar, tienen el problema de provocar efectos secundarios, tales como diarrea, cuando se toman en cantidades excesivas, la D-psicosa prácticamente no tiene efectos secundarios (Matsue, T., Y. Baba, M. Hashiguchi, K. Takeshita, K. Izumori y H. Suzuki. 2001. Dietary D-psicose, a C-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 10:233-237.; Matsuo, T., and K. Izumori. 2004. D-psicose, a rare sugar that provides no energy and additionally beneficial effects for clinical nutrition. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 13:5127).

- 25 Por estas razones, la D-psicosa se está convirtiendo en el centro de atención del sector de la industria alimentaria como edulcorante para dieta y, en consecuencia, existe una necesidad creciente de desarrollar un método para producir D-psicosa de forma eficaz.

- 30 Los métodos convencionales para producir D-psicosa mediante el uso de una psicosa-epimerasa se han centrado en el desarrollo de un proceso de epimerización de D-psicosa a partir de D-fructosa empleando una enzima recombinante expresada masivamente en una *E. coli* recombinante o una célula huésped que la contiene. Sin embargo, la producción biotecnológica de C-psicosa utilizando dicha *E. coli* recombinante es inadecuada para la obtención de D-psicosa como material alimentario en términos de seguridad alimentaria. Para producir D-psicosa adecuada para su uso como material alimentario es necesario desarrollar un método de producción en masa utilizando una psicosa-epimerasa expresada en una célula huésped perteneciente a una cepa GRAS (*Generally Recognized as Safe* - generalmente considerada inocua) y una cepa que permita una producción industrial en masa, o utilizando un huésped que incluya la misma.

- 40 La calificación GRAS se otorga a sustancias generalmente consideradas inocuas cuando expertos cualificados por una formación y una experiencia científicas evalúan su seguridad mediante procedimientos científicos bajo las condiciones de su uso previsto. La calificación GRAS es un sistema único aplicado exclusivamente en EEUU, pero su importancia y necesidad han sido reconocidas internacionalmente al igual que en EEUU. Por ello, se está prestando atención al desarrollo de la calificación GRAS.

- Además, para la producción industrial de D-psicosa es necesario desarrollar un método para producir D-psicosa a partir de un sustrato menos costoso. Actualmente, debido a la alta especificidad de sustrato de la psicosa-epimerasa, como sustrato para la producción de D-psicosa únicamente se utiliza la costosa D-fructosa.

- 45 La US 2008/124770 A1 describe una arabinosa isomerasa termófila y un método para producir tagatosa utilizando la misma. En concreto, se refiere a un gen codificador de arabinosa isomerasa procedente de la *Thermotoga neapolitana* termófila DSM 5068, un vector de expresión recombinante que contiene el gen, a un método para preparar una arabinosa isomerasa termófila de uso alimentario a partir de la cepa GRAS recombinante transformada con dicho vector de expresión, y a un método para preparar tagatosa a partir de galactosa utilizando dicha enzima.

- 50 Además se conoce un método para utilizar L-arabinosa isomerasa derivada de *Geobacillus stearothermophilus* (GSAI) y expresada en un huésped GRAS de *Bacillus subtilis* para la producción de

tagatosa comestible. (Cheon Jina y col., "Characterization of L-Arabinose Isomerase in *Bacillus subtilis*, a GRAS Host, for the Production of Edible Tagatose").

- 5 Kim, H.-J. y col., "Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* D-Psicose 3-Epimerase That Converts D- Fructose to D-Psicose", *Appl. Environ. Microbiol.* (2006), Vol. 72, N° 2, pp. 981-985, describen un gen no caracterizado previamente propuesto como el gen de D-tagatosa 3-epimerasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Este gen fue clonado y expresado en *Escherichia coli*. La enzima expresada produce D-psicosa a partir de D-fructosa.

- 10 La US 2005/0250937 A9 se refiere a la producción de lisina y proporciona varias moléculas de polinucleótido aisladas útiles para la producción de L-lisina. También se refiere a métodos para producir y utilizar los polinucleótidos y métodos para aumentar la producción de L-lisina. La L-lisina se puede obtener por fermentación a escala industrial utilizando los polinucleótidos y métodos para aumentar la producción de L-lisina. La L-lisina se puede obtener por fermentación a escala industrial utilizando *Corynebacterium glutamicum* Gram positiva, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum*.

- 15 De la EP 1 357 182 A1 se conoce un proceso para producir UDP-N-acetilgalactosamina y un carbohidrato que contiene N-acetilgalactosamina. Algunos carbohidratos que contienen N-acetilgalactosamina son expresados específicamente en células cancerosas, etc. y, por tanto, son útiles como vacunas contra el cáncer, etc. para el tratamiento contra el cáncer.

Descripción

Problema Técnico

- 20 La presente invención se ha estudiado activamente para producir D-psicosa en masa, que puede utilizarse como un material alimentario, y se ha comprobado que es posible una producción sucesiva de D-psicosa a partir de D-fructosa o D-glucosa empleando una inmovilización con el fin de proporcionar un entorno estable para la activación enzimática, con el fin de producir en masa de D-psicosa, y utilizando una D-glucosa isomerasa junto con una psicosa-epimerasa.
- 25 Un objeto de la presente invención es proporcionar una psicosa-epimerasa en una forma segura para la alimentación para la preparación de D-psicosa, que puede ser utilizada como material alimentario.
- Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir sucesivamente D-psicosa a partir de D-glucosa o D-fructosa mediante el uso de una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa en una forma inmovilizada segura para la alimentación.

Solución Técnica

- La presente invención proporciona un método para preparar D-psicosa a partir de D-fructosa mediante el uso de una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* que es expresada en una cepa GRAS.
- El método de la presente invención incluye los pasos de: expresar una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* en una cepa GRAS; y preparar D-psicosa a partir de D-fructosa utilizando la psicosa-epimerasa expresada contenida en un cultivo de la cepa GRAS inmovilizada sobre un soporte.
- 35 La cepa GRAS que expresa una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* puede ser una cepa transformada con un vector de expresión recombinante que incluye un gen codificador de la enzima arriba mencionada.
- La psicosa-epimerasa utilizada en la preparación de D-psicosa de acuerdo con la presente invención puede estar en una forma contenida en un cultivo de la cepa GRAS, inmovilizada sobre un soporte que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* o aislada del cultivo. La cepa GRAS puede ser una cepa transformada con un vector de expresión recombinante que incluye un gen codificador de una psicosa-epimerasa. La cepa GRAS puede ser de *Corynebacterium* sp., preferentemente de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046.
- 40 Preferentemente, la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada en el método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
- El método para preparar D-psicosa de acuerdo con la presente invención puede comprender además el paso de inmovilizar la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa sobre un soporte. El soporte adecuado para la presente invención puede incluir alginato, preferentemente alginato de sodio, pero no está limitado a éste.

El método para preparar D-psicosa de acuerdo con la presente invención puede comprender además los pasos de empaquetar una columna con el soporte sobre el que está inmovilizada la psicosa-epimerasa y suministrar una solución de D-fructosa a la columna de lecho fijo.

- 5 Además, la presente invención proporciona adicionalmente un método para preparar D-psicosa a partir de D-glucosa, que incluye el paso de inmovilizar una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa sobre soportes. El soporte adecuado para la presente invención puede incluir alginato, preferentemente alginato de sodio, pero no está limitado a éste.

- 10 En el método arriba descrito, la psicosa-epimerasa puede estar contenida en un cultivo de la cepa GRAS, inmovilizada sobre un soporte que puede expresar psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* o aislada del cultivo. La cepa GRAS puede ser una cepa transformada con un vector de expresión recombinante que incluye un gen codificador de psicosa-epimerasa. Además, la cepa GRAS puede ser de *Corynebacterium* sp., preferentemente de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046.

Preferentemente, la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada en el método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

- 15 Además, la presente invención proporciona también un método para preparar D-psicosa a partir de D-glucosa que comprende los pasos de: inmovilizar una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa sobre soportes; empaquetar una columna con los soportes sobre los que están inmovilizadas la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa; y suministrar una solución de D-glucosa a la columna de lecho fijo. Los soportes sobre los que están inmovilizadas la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa se
20 pueden empaquetar en la misma columna o se pueden empaquetar respectivamente en dos columnas separadas. No obstante, es preferible que el soporte esté empaquetado en una columna independiente y, en este caso, las dos columnas independientes están conectadas entre sí.

La presente invención proporciona una cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046 útil para la preparación de D-psicosa a partir de D-fructosa o D-glucosa.

- 25 Tal como se utiliza aquí, el concepto "forma segura para la alimentación" significa que es suficientemente segura para ser utilizada como material alimentario. Por tanto, el concepto "expresado en una forma segura para la alimentación" significa que un gen diana ha sido expresado en una cepa considerada como segura y no causante de efectos nocivos aunque sea utilizada como material alimentario, por ejemplo una cepa GRAS.

- 30 En una realización de la presente invención, un método para transformar la cepa GRAS con un vector recombinante puede incluir una electroporación, pero la invención no está limitada a este método y se puede llevar a cabo empleando cualquier método de transformación conocido por los especialistas en la técnica a la que pertenece la presente invención.

- 35 En una realización de la presente invención, el vector recombinante que incluye el gen codificador de la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* puede incluir el gen codificador de psicosa-epimerasa unido funcionalmente con un promotor que es activo en bacterias *Corynebacterium* sp. El promotor puede presentar una de las secuencias de SEQ ID N°: 2 a 8, que de forma confirmada expresan un gen diana más eficientemente que un promotor tac en bacterias *Corynebacterium* sp. (Publicación de Patente Coreana N° 2006-0068505).

- 40 El término "psicosa-epimerasa", tal como se utiliza aquí, significa una D-psicosa-3-epimerasa que presenta una actividad de conversión de D-fructosa a D-psicosa.

- 45 En una realización de la presente invención, la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o consistir en fragmentos funcionales de ésta. Un fragmento funcional significa un fragmento que incluye mutaciones por sustitución, inserción, delección o similares de algunos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1, y que presenta una actividad de conversión de D-fructosa a D-psicosa.

En una realización de la presente invención, la cepa GRAS puede ser una cepa de *Corynebacterium* sp.

- 50 La cepa de *Corynebacterium* sp. es un microorganismo industrial que produce sustancias químicas de diversos usos en el campo de los piensos, la medicina y la alimentación, etc., incluyendo L-lisina, L-treonina y diversos ácidos nucleicos. Dicha cepa de *Corynebacterium* sp. es una cepa GRAS (*Generally Recognized as Safe* - generalmente considerada inocua) y tiene la propiedad de ser fácil de manipular genéticamente y de cultivar en masa. Además, la cepa de *Corynebacterium* sp. tiene una alta estabilidad bajo diversas condiciones de proceso, tiene una estructura de pared celular relativamente rígida en comparación con otras

bacterias, con lo que tiene la propiedad biológica de existir en una masa celular en un estado estable incluso bajo una alta presión osmótica por una alta concentración de azúcar, etc.

En una realización de la presente invención, la cepa de *Corynebacterium* sp. puede ser *Corynebacterium glutamicum*.

- 5 En una realización de la presente invención, la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* puede ser una cepa recombinante de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046.

- 10 La psicosa-epimerasa se puede modificar fácilmente mediante una mutagénesis conocida convencionalmente por los especialistas, como evolución dirigida y mutagénesis dirigida, etc. Por tanto, se debe considerar que las enzimas recombinantes que tienen una homología de secuencia de una magnitud determinada, como una homología de secuencia de un 70% o más, preferentemente un 80% o más, de forma especialmente preferente un 90% o más, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la psicosa-epimerasa representada por la SEQ ID N°: 1 y que son expresadas como una forma activa en la cepa GRAS, y una célula huésped que incluye las mismas, están dentro del alcance de la presente invención.

- 15 El cultivo de la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* se puede obtener cultivando las bacterias transformadas en un medio y bajo condiciones de cultivo fácilmente seleccionadas por los especialistas en la técnica a la que pertenece la presente invención, en función de las propiedades de la cepa. El método de cultivo puede incluir cualquier método de cultivo conocido por los especialistas, como cultivo por lotes, continuo o por lotes alimentados, pero no está limitado a éstos.

- 20 El método para preparar D-psicosa de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir el paso de separar la psicosa-epimerasa del cultivo de la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*.

- 25 En una realización de la presente invención, las células separadas del cultivo de la cepa que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* por centrifugación, filtración etc.; o el sobrenadante obtenido por homogeneización y centrifugación de las células separadas; o la psicosa-epimerasa separada y purificada del sobrenadante por fraccionamiento, cromatografía, etc. pueden emplearse como una enzima para convertir D-fructosa en D-psicosa.

En una realización de la presente invención, la psicosa-epimerasa puede estar en forma de la masa celular en el cultivo o de la psicosa-epimerasa separada de la masa celular.

- 30 En una realización de la presente invención, el paso de preparación de D-psicosa puede comprender adicionalmente el paso de inmovilizar la psicosa-epimerasa, o la masa celular que la expresa, sobre un soporte.

- 35 Dado que en caso de inmovilización de la enzima o la masa celular sobre un soporte se puede proporcionar un entorno para mantener la actividad durante mucho tiempo, la inmovilización ha sido utilizada en el método de producción industrial utilizando una enzima o un microorganismo. El soporte que puede ser utilizado para la inmovilización puede incluir alginatos tales como alginato de sodio, pero no está limitado a éstos.

- 40 En una realización de la presente invención, la inmovilización se puede llevar a cabo utilizando alginato de sodio como soporte. El alginato de sodio es un polisacárido coloidal natural que está presente abundantemente en la pared celular de algas, que consiste en ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, y que está formado por enlaces β -1,4 aleatorios en contenido y, por tanto, resulta ventajoso que la masa celular o las enzimas se puedan inmovilizar de forma estable sobre el mismo.

En una realización de la presente invención, la inmovilización se puede llevar a cabo utilizando entre un 1,5% y un 4,0% de alginato de sodio como soporte.

- 45 En una realización de la presente invención, la inmovilización se puede llevar a cabo utilizando un 2% de alginato de sodio como soporte.

- 50 En una realización de la presente invención, empleando alginato de sodio como soporte para la inmovilización, la inmovilización se puede llevar a cabo añadiendo un volumen entre igual y doble de una solución acuosa de alginato de sodio a una muestra que contiene la enzima o la masa celular, añadiendo gota a gota la mezcla resultante a una solución 0,1M de iones calcio para crear la enzima o el complejo de masa celular-alginato en perlas utilizando una bomba de jeringa y una bomba de vacío.

En una realización de la presente invención, el paso de inmovilizar la psicosa-epimerasa sobre el soporte puede comprender además los pasos de empaquetar una columna con la enzima inmovilizada y suministrar una solución de D-fructosa a la columna empaquetada.

- 5 La columna a empaquetar con el soporte sobre el que está inmovilizada la enzima o la masa celular y el método de empaquetamiento de la columna con el mismo pueden seleccionarse adecuada y fácilmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece la presente invención, en función de la enzima o la masa celular, o del soporte de inmovilización utilizado.

- 10 En una realización de la presente invención es posible preparar una columna de lecho fijo empaquetando la columna con la enzima inmovilizada. La reacción enzimática, es decir, la conversión de D-fructosa en D-psicosa, se puede llevar a cabo suministrando a la columna de lecho fijo una solución de D-fructosa que es un sustrato de la misma.

- 15 En una realización de la presente invención, cuando a la columna de lecho fijo que está empaquetada con la masa celular que incluye la psicosa-epimerasa se le suministra la solución de D-fructosa en una concentración constante, la masa celular inmovilizada continúa la reacción de epimerización, lo que conduce a la conversión de D-fructosa en D-psicosa. La D-psicosa convertida se somete a separación y purificación utilizando columnas de separación, y después está disponible como D-psicosa pura.

- 20 El concepto "reactor de inmovilización" tal como se utiliza aquí significa un reactor en el que la reacción para la producción de D-psicosa tiene lugar mediante la masa celular o la enzima inmovilizada sobre el soporte, o la columna empaquetada con la masa celular o la enzima inmovilizada sobre el soporte. En concreto, la inmovilización significa que una sustancia que proporciona actividades biológicas, en este caso una psicosa-epimerasa o una D-glucosa epimerasa o una masa celular que la incluye, se inmoviliza sobre el soporte.

- 25 El término "estabilidad operativa" tal como se utiliza aquí significa que un reactor biológico para la producción sucesiva de un producto diana tal como D-psicosa puede funcionar manteniendo un nivel adecuado de productividad en comparación con la actividad inicial del mismo, y generalmente está representado por un período de operación.

En una realización de la presente invención, a la columna empaquetada con el soporte sobre el que están inmovilizadas las células que expresan la psicosa-epimerasa se le suministran 300 g/l de D-fructosa con un caudal de entrada de 0,1 ml/min a 50°C, lo que permite garantizar 25 días o más de estabilidad operativa.

- 30 La presente invención también proporciona un método para preparar D-psicosa a partir de D-glucosa, que incluye el paso de inmovilizar una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa sobre soportes.

Tal como se describe más arriba, dado que la D-fructosa utilizada como sustrato para la psicosa-epimerasa es cara, es necesario producir D-psicosa a partir de un sustrato barato como D-glucosa para la producción industrial en masa de D-psicosa. La D-glucosa isomerasa es una enzima para convertir D-glucosa en D-fructosa. Por ello es posible producir D-psicosa a partir de D-glucosa utilizando estas dos enzimas.

- 35 En una realización de la presente invención, la psicosa-epimerasa puede ser el cultivo de la cepa GRAS, inmovilizada sobre un soporte, que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*, o la masa celular o la psicosa-epimerasa separada del cultivo.

En una realización de la presente invención, la D-glucosa isomerasa puede ser el cultivo de la cepa GRAS que expresa la D-glucosa isomerasa, o la masa celular o la D-glucosa isomerasa separada del cultivo.

- 40 En una realización de la presente invención, la psicosa-epimerasa puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

En una realización de la presente invención, la D-glucosa isomerasa puede ser comercial. Por ejemplo, se puede utilizar la D-glucosa isomerasa o la D-glucosa isomerasa inmovilizada comercial de Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca).

- 45 La D-glucosa isomerasa es una enzima representativa para convertir D-glucosa en D-fructosa y actualmente se utiliza para producir fructooligosacáridos. Entre las enzimas actualmente utilizadas para la producción industrial, la D-glucosa isomerasa es una de las enzimas cuyas actividades y mecanismos han sido claramente identificados.

- 50 En una realización de la presente invención, la cepa GRAS puede ser una cepa transformada con un vector recombinante que incluye un gen codificador de la psicosa-epimerasa y un gen codificador de la D-glucosa

isomerasa o una cepa cotransformada con vectores recombinantes que incluyen cada uno de los genes arriba descritos.

En una realización de la presente invención, la cepa GRAS puede ser la bacteria *Corynebacterium* sp.

- 5 En una realización de la presente invención, la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* puede ser la cepa recombinante *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046.

En una realización de la presente invención, el soporte para la inmovilización puede ser alginato de sodio.

En una realización de la presente invención, la inmovilización se puede llevar a cabo utilizando entre un 1,5% y un 4,0% de alginato de sodio como soporte.

- 10 En una realización de la presente invención, la inmovilización se puede llevar a cabo utilizando un 2% de alginato de sodio como soporte.

- 15 En una realización de la presente invención, mediante el uso de alginato de sodio como soporte para la inmovilización, la inmovilización se puede llevar a cabo añadiendo un volumen entre igual y doble de la solución acuosa de alginato de sodio a la muestra que contiene la enzima o la masa celular, añadiendo gota a gota la mezcla resultante a una solución 0,1M de iones calcio para crear la enzima o el complejo de masa celular-alginato en perlas utilizando la bomba de jeringa y la bomba de vacío.

En una realización de la presente invención, el gen codificador de la psicosa-epimerasa y el gen codificador de la D-glucosa isomerasa se pueden expresar en la misma cepa GRAS o en dos cepas GRAS diferentes, respectivamente, y el paso de inmovilización se puede llevar a cabo inmovilizando las células de las cepas GRAS cultivadas o una mezcla de dos enzimas separadas de las células sobre los soportes.

- 20 En una realización de la presente invención, el cultivo de la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa o la masa celular de la psicosa-epimerasa separada del cultivo y la D-glucosa isomerasa se pueden inmovilizar sobre soportes, respectivamente.

En una realización de la presente invención, el método de la presente invención puede incluir además el paso de empaquetar la columna con el soporte sobre el que están inmovilizadas las células o las enzimas.

- 25 El método para preparar D-psicosa a partir de D-glucosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además los pasos de empaquetar la columna con la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa inmovilizadas y suministrar la solución de D-glucosa a la columna empaquetada.

- 30 En una realización de la presente invención, la columna de lecho fijo se puede preparar empaquetando la columna con las enzimas inmovilizadas. La reacción enzimática, es decir, la conversión de D-glucosa en D-psicosa se puede llevar a cabo suministrando a la columna de lecho fijo la solución de D-glucosa que es un sustrato de la misma.

En una realización de la presente invención, la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa inmovilizadas se pueden empaquetar en columnas independientes respectivas.

- 35 La columna a empaquetar con el soporte sobre el que están inmovilizadas las enzimas o las células y el método de empaquetamiento de la columna con el mismo pueden seleccionarse adecuada y fácilmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece la presente invención, en función de las enzimas o la masa celular o del soporte de inmovilización utilizado. En una realización de la presente invención es posible empaquetar dos columnas independientes con el soporte inmovilizado con psicosa-epimerasa y el soporte inmovilizado con D-glucosa isomerasa, respectivamente, conectar estas dos columnas poniéndolas en comunicación entre sí para transferir D-fructosa como un producto de isomerización desde la columna empaquetada con la D-glucosa isomerasa a la columna empaquetada con la psicosa-epimerasa, e inducir la reacción de conversión de la D-fructosa en D-psicosa. Cuando la solución de D-glucosa como sustrato se suministra al reactor de inmovilización consistente en dichas dos columnas comunicadas, la D-glucosa se convierte en D-fructosa en la columna empaquetada con la D-glucosa isomerasa, y la D-fructosa transferida a la columna empaquetada con la psicosa-epimerasa se convierte en D-psicosa. Por tanto, es posible obtener D-psicosa como producto final a partir de D-glucosa.
- 40
- 45

Efectos Ventajosos

- 50 El método para preparar D-psicosa de acuerdo con la presente invención permite producir de forma masiva y con éxito D-psicosa en una forma segura para la alimentación, que puede ser utilizada como material alimentario, a partir de D-glucosa o D-fructosa.

Breve Descripción de las Figuras

- Fig. 1: ilustra esquemáticamente un proceso para construir un vector de expresión recombinante pCJ-1-ATPE que incluye un gen codificador de una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 5 Fig. 2: ilustra los resultados de la medida de la actividad de la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* por HPLC para el método de acuerdo con una realización de la presente invención, mostrando la Fig. 2a un patrón de referencia para cada azúcar y la Fig. 2b la conversión mediante una o más reacciones.
- 10 Fig. 3: ilustra el porcentaje de conversión de D-fructosa en D-psicosa utilizando la cepa recombinante para el método de acuerdo con una realización de la presente invención bajo condiciones combinadas de 100 g/l (3a), 300 g/l (3b) o 500 g/l (3c) de D-fructosa, y 40°C, 45°C o 50°C de temperatura de reacción.
- Fig. 4: ilustra la productividad de D-psicosa dependiendo del caudal de entrada de D-fructosa como sustrato para el método de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 15 Fig. 5: ilustra la estabilidad operativa de un reactor de inmovilización a una temperatura de reacción de 50°C para el método de acuerdo con una realización de la presente invención. Una actividad relativa (%) significa una actividad relativa a la actividad en el momento en el que se inicia la operación.
- 20 Fig. 6: ilustra el porcentaje de conversión de D-glucosa en D-psicosa utilizando la cepa recombinante inmovilizada que expresa la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa inmovilizada bajo condiciones combinadas de 100 g/l (6a), 300 g/l (6b) o 500 g/l (6c) de D-glucosa, y 40°C, 45°C o 50°C de temperatura de reacción para el método de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 25 Fig. 7: ilustra la productividad de D-psicosa dependiendo del caudal de entrada de D-glucosa para el método de acuerdo con una realización de la presente invención.

Mejor forma de realización

La presente invención se ilustra más detalladamente a continuación mediante los siguientes ejemplos específicos. No obstante, dichos ejemplos son ilustrativos y el alcance de la invención no está limitado por los mismos.

30 Medida de las actividades de psicosa-epimerasa y D-glucosa isomerasa

- Las actividades de una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa se midieron utilizando D-fructosa y D-glucosa como sustrato, respectivamente. Las enzimas o muestras que las contienen se añadieron a un tampón 50 mM de PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)) (pH 8,0) que contenía 100 g/l de los sustratos. Después tuvo lugar la reacción a 50°C durante una hora y la reacción se interrumpió calentando a 100°C durante 5 minutos. Las concentraciones de D-fructosa, D-glucosa y D-psicosa se midieron por HPLC equipada con un detector de RI (*Refractive Index* - Índice de Refracción). El análisis por HPLC se llevó a cabo inyectando una muestra en una columna Supelcogel Pb a 80°C y pasando después agua destilada como fase móvil a través de la columna, a un caudal de 0,5 ml/min. La D-psicosa se separó en un tiempo de retención de aproximadamente 32 minutos y su porcentaje de conversión y productividad se calcularon en base a la cantidad cuantitativa de un patrón de referencia de D-psicosa. Para el análisis comparativo de actividades enzimáticas, una unidad de una enzima se definió como la cantidad de la enzima para producir un μmol de D-psicosa a pH 8,0 y 50°C.
- 35
- 40

Ejemplo 1: Cepa recombinante que expresa una psicosa-epimerasa**(1) Preparación de una cepa recombinante**

- 45 Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR - *polymerase chain reaction*) para amplificar un gen codificador de una psicosa-epimerasa utilizando un ADN genómico de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 33970 como plantilla y oligonucleótidos de las SEQ ID N°: 9 y 10 con sitios de reconocimiento de enzima de restricción PstI y XbaI, respectivamente, como cebadores. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: después de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, 26 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 68°C, después extensión a 68°C durante 10 minutos. Para la expresión en masa de la psicosa-epimerasa codificada por el gen amplificado, el producto de PCR amplificado se digirió con las enzimas de restricción PstI y XbaI, y se insertó en un vector transportador pCJ-1 derivado de bacterias *Corynebacterium* sp. (depositado en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), una institución depositaria internacional, el 6 de noviembre de 2004, bajo el número de depósito KCCM-10611), para construir un vector de expresión recombinante pCJ-1-ATPE. La Fig. 1 muestra esquemáticamente el
- 50
- 55

método para preparar el vector de expresión recombinante pCJ-1-ATPE que incluye el gen codificador de la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*.

- 5 El vector de expresión recombinante pCJ-1-ATPE se introdujo en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 mediante transformación utilizando electroporación, para preparar la cepa recombinante que expresa el gen codificador de la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa recombinante se designó *Corynebacterium glutamicum* ATPE y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea) bajo el número de depósito KCCM 11046 el 26 de octubre de 2009, bajo el Tratado de Budapest.

(2) Expresión de una psicosa-epimerasa

- 10 En un medio MB (Bacto-trypton 10 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, Soytone 5 g/l) que incluía 10 µg/ml de kanamicina se inocularon las cepas recombinantes obtenidas en el punto (1) más arriba, respectivamente, en una concentración inicial de OD600 = 0,1, seguida por incubación a 30°C durante 24 horas para inducir la expresión de la recombinación de psicosa-epimerasa. En un fermentador con recipiente de 5 litros que contenía 3 litros de un medio de modificación (80 g/l de D-glucosa, 20 g/l de soytone, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1,2 g/l de KH₂PO₄, 1,4 g/l de MgSO₄), incluyendo 10 mg/ml de kanamicina, se inoculó el cultivo
- 15 arriba obtenido a OD600 = 0,6, seguido por una incubación a 30°C durante 20 horas. Con el fin de medir la actividad de la psicosa-epimerasa expresada, el cultivo se sometió a centrifugación a 8000xg durante 10 minutos para cosechar células. Después, las células cosechadas se resuspendieron en un tampón EPPS 50 mM (pH 8,0) (Sigma-Aldrich) y la suspensión resultante se sometió a ultrasonificación, lo que condujo a la lisis
- 20 de las células. El lisado celular se sometió a centrifugación para obtener un sobrenadante que contenía la psicosa-epimerasa, y se llevó a cabo una reacción de epimerización de D-fructosa utilizando el sobrenadante como enzima. En la reacción de epimerización se utilizó la medición de la actividad de la psicosa-epimerasa tal como se describe más arriba. La Fig. 2b muestra los resultados del análisis por HPLC de la reacción de epimerización.

25 Ejemplo 2: Inmovilización de una cepa recombinante y preparación de D-psicosa

(1) Inmovilización de una cepa recombinante

- Para la producción en masa de D-psicosa, en este ejemplo se inmovilizó sobre el soporte una *Corynebacterium glutamicum* ATPE (KCCM 11046) que expresa la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y preparada en el Ejemplo 1 mostrado más arriba. Para la inmovilización de la
- 30 cepa recombinante, en primer lugar el medio de modificación para *Corynebacterium* utilizado en el Ejemplo 1 se inoculó en la cepa recombinante en una concentración inicial de OD600 = 0,6 y después se llevó a cabo la incubación a 30°C durante 20 horas. Una vez completa la incubación, el cultivo resultante se sometió a centrifugación para recuperar las células, que se resuspendieron en el tampón EPPS 50 mM (pH 8,0) hasta un 20%. Las células resuspendidas de la cepa recombinante se añadieron a un 2% (v/v) de una solución acuosa de alginato de sodio. La mezcla resultante se añadió gota a gota a una solución de CaCl₂ 100 mM
- 35 utilizando la bomba de jeringa y la bomba de vacío para crear un complejo de células-alginato en el que las células estaban atrapadas en perlas de alginato de sodio.

(2) Preparación de D-psicosa utilizando la cepa recombinante inmovilizada

- Una columna de lecho fijo XK16 (16 mm X 20 mm, Amersham pharmacia) se empaquetó con la cepa recombinante inmovilizada sobre alginato de sodio obtenida en el anterior punto (1) y después se midió el porcentaje de conversión de D-fructosa en D-psicosa. Con el fin de determinar una temperatura de reacción
- 40 óptima de un reactor de inmovilización y una concentración de sustrato de D-fructosa, la reacción de conversión de D-fructosa en D-psicosa se llevó a cabo bajo condiciones combinadas de 40°C, 45°C y 50°C de temperatura de reacción y 100 g/l, 300 g/l y 500 g/l de concentración de D-fructosa. De acuerdo con las Fig. 3a a 3c se comprobó que la mejor conversión se logra a una temperatura de 50°C y con una
- 45 concentración de D-fructosa de 100 g/l, y las concentraciones de D-fructosa de 300 g/l y 500 g/l también produjeron una alta conversión. Además, a diferencia de otras reacciones de conversión de D-glucosa, la reacción de epimerización de D-psicosa presentaba una baja dependencia de la temperatura.

(2-1) Productividad en función del caudal de entrada de D-fructosa

- 50 La columna de lecho fijo XK16 se empaquetó con la cepa recombinante inmovilizada tal como se describe más arriba y después se midió la productividad de D-psicosa en función del caudal de entrada de D-fructosa. En base a los resultados del anterior punto (2), la concentración de D-fructosa y la temperatura de reacción se ajustaron a 300 g/l y 50°C, respectivamente. La productividad se midió ajustando el caudal de entrada de D-fructosa, siendo un sustrato de 0,4, 1, 2, 4 y 8 h⁻¹ de velocidad espacial (1/h). Los resultados se muestran
- 55 más abajo en la Tabla 1 y en la Fig. 4.

Tabla 1. Productividad y porcentaje de conversión en función del caudal de entrada de D-fructosa

Caudal de entrada (ml/min)	D-fructosa (g/l)	D-psicosa (g/l)	Productividad (g/l/h)	Conversión (%)
3	281,388	3,693	33	1,30
2	289,215	3,309	20	1,13
1	291,268	7,579	23	2,54
0,5	284,639	12,055	18	4,06
0,25	286,463	20,579	15	6,70
0,1	260,096	38,041	11	12,76

(2-2) Estabilidad operativa

- La operación se llevó a cabo a 50°C utilizando las cepas recombinantes inmovilizadas, que se empaquetaron en la columna de lecho fijo XK16 hasta que las actividades específicas de las mismas llegaron al 50%, respectivamente, con el fin de medir la estabilidad operativa de las cepas recombinantes inmovilizadas empaquetadas en la columna. La concentración de sustrato de D-fructosa era de 300 g/l y su caudal de entrada era de 0,1 min/ml (velocidad espacial 0,4 h⁻¹). Se comprobó que bajo estas condiciones de reacción se podía mantener una estabilidad operativa durante 25 días o más.

- 10 La Fig. 5 muestra la estabilidad operativa de la o las cepas recombinantes inmovilizadas a una temperatura de reacción de 50°C.

Ejemplo 3: Preparación de D-psicosa a partir de D-glucosa utilizando la cepa/enzima recombinante inmovilizada

(1) Productividad en función de la temperatura de reacción y la concentración de D-glucosa

- 15 Las columnas de lecho fijo XK16 (16 mm X 20 mm, Amersham pharma) se empaquetaron con la cepa recombinante inmovilizada sobre alginato de sodio obtenida en el anterior Ejemplo 2 y con 10 g de la D-glucosa isomerasa inmovilizada (Novozymes, Dinamarca), respectivamente, y después se midió el porcentaje de conversión de D-glucosa en D-psicosa. Con el fin de determinar las condiciones de reacción óptimas para las dos enzimas mezcladas, la reacción de conversión de D-glucosa en D-psicosa se llevó a cabo bajo condiciones combinadas de 40°C, 45°C o 50°C de temperatura de reacción y 100 g/l, 300 g/l y 500 g/l de concentración de D-glucosa. La Fig. 6 muestra el porcentaje de conversión de D-glucosa en D-psicosa en función de cambios en la temperatura de reacción y la concentración de sustrato. De acuerdo con las Fig. 6a a 6c, a diferencia de la reacción de epimerización para la D-psicosa, la reacción de isomerización para la D-glucosa era una reacción dependiente de la temperatura. Es decir, cuanto más alta era la temperatura de reacción, más rápida era la velocidad de conversión de D-glucosa en D-psicosa. Se comprobó que esto influía finalmente en la productividad de la D-psicosa. La mejor conversión de D-glucosa en D-fructosa se logró a una temperatura de 50°C y no había ninguna diferencia significativa en la velocidad de reacción al aumentar la concentración del sustrato. Estos resultados demuestran que es posible utilizar el reactor de inmovilización con una concentración de sustrato más alta y aumentar la productividad de D-psicosa a partir de D-glucosa.

(2) Productividad en función del caudal de entrada de D-glucosa

- 35 Las dos columnas de lecho fijo se empaquetaron con la cepa recombinante inmovilizada incluyendo una psicosa-epimerasa y D-glucosa isomerasa inmovilizada, respectivamente, y después se midió la productividad de D-psicosa en función del caudal de entrada de D-glucosa. En base a los resultados de los ejemplos anteriores, la concentración de D-glucosa y la temperatura de reacción se ajustaron a 300 g/l y 50°C, respectivamente. La productividad se midió ajustando el caudal de entrada de D-fructosa, siendo un sustrato de 0,4, 1, 2, 4 y 8 h⁻¹ de velocidad espacial (1/h). Los resultados se muestran más abajo en la Tabla 2 y en la Fig. 7.

Tabla 2. Productividad y porcentaje de conversión en función del caudal de entrada de D-glucosa

Caudal de entrada (ml/min)	D-glucosa (g/l)	D-fructosa (g/l)	Productividad (g/l/h)	Conversión (%)
4	281,465	31,136	374	9,96
3	278,849	40,042	360	12,56
2	267,061	50,196	301	15,82
1	238,615	78,854	237	24,84
0,5	207,168	113,081	170	35,31
0,1	172,826	155,850	47	47,42

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	CJ CheilJedang Corporation
5	<120>	INMOVILIZACIÓN DE PSICOSA-EPIMERASA Y MÉTODO PARA PRODUCIR D-PSICOSA
	<150>	KR20090092784
	<151>	30-09-2009
10	<150>	KR20090118465
	<151>	02-12-2009
	<160>	10
15	<170>	KopatentIn 1.71
	<210>	1
	<211>	289
	<212>	PRT
20	<213>	Secuencia Artificial
	<220>	
	<223>	D-psicosa 3-epimerasa a partir de Agrobacterium tumefaciens
	<400>	1
		Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
		1 5 10 15
		Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
		20 25 30
		Ile Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
		35 40 45
		Ala Thr Ile Arg Lys Ser Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala
		50 55 60
		Gly Ile Gly Pro Ser Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ala Ala
		65 70 75 80
25		Val Arg Ala Ala Gly Lys Ala Phe Phe Glu Arg Thr Leu Ser Asn Val
		85 90 95

Ala Lys Leu Asp Ile His Thr Ile Gly Gly Ala Leu His Ser Thr Trp
100 105 110

Pro Ile Asp Tyr Ser Gln Pro Val Asp Lys Ala Gly Asp Tyr Ala Arg
115 120 125

Gly Val Glu Gly Ile Asn Gly Ile Ala Asp Phe Ala Asn Asp Leu Gly
130 135 140

Ile Asn Leu Cys Ile Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Asn His Tyr Leu
145 150 155 160

Asn Thr Ala Ala Glu Gly Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Lys Asn
165 170 175

Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Asp
180 185 190

Ser Phe Gly Asp Ala Ile Arg Thr Ala Gly Pro Leu Leu Gly His Phe
195 200 205

His Thr Gly Glu Ser Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro
210 215 220

Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala
225 230 235 240

Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp
245 250 255

Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met
260 265 270

Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Tyr Leu Gly
275 280 285

Gly

- 5 <210> 2
<211> 301
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> promotor CJ1
- <400> 2

ES 2 614 891 T3

		caccgcgggc ttattccatt acatggaatg accaggaatg gcaggggaatg cgacgaaatt	60
		gactgtgtcg ggagcttctg atccgatgct gcccaaccagg agagaaaata atgacatgtg	120
		caggcacgct ggtgagctgg agatttatga tctcaagtac cttttttctt gcactcgagg	180
		gggctgagtg ccagaatggg tgctgacacc aggttgaggt tggtagacac tcaccaatcc	240
		tgccgtcgcg ggcgcctgcg tggaacataa accttgagtg aaaccaatc taggagatta	300
		a	301
5	<210>	3	
	<211>	285	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
10	<220>		
	<223>	promotor CJ2	
	<400>	3	
		aattccacca gacgttgttt agtaagtgcc cgaattctcg gttggtgcag ttgcttttcg	60
		atgaatggga gaacctcgaa tacttccgcg tctctacttt ccggtacgtg ccacacagag	120
		cagagcaatc ggtggaagag cacgacagat tagtagcgct tatcgaagcc caggcagaag	180
		atttctacat cgaatcccaa gcccgaacc accgcctgac aaccgcaacg acctaccgcc	240
		aacgttttaa ttccgaaaat catcacgaag aacaaggagt gcaca	285
15	<210>	4	
	<211>	291	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
20	<220>		
	<223>	promotor CJ3	
	<400>	4	
		gctgcctaca tctggacttc tgacctgaag cgctcccaca acttcgcgca aaacgttgaa	60
		gccggcatgg tctggttgaa ctccaacaac gtccgtgacc tgcgcaaccc attcgggtggc	120
		gtcaaggcat ccggtctggg gcatgagggc ggctaccgct ccattgactt ctacaccgac	180
		caacaggccg tacacatcaa cttaggcgaa gtccacaacc cagtcttcgg caagcaaacc	240
25		aactaattct ccctcatcca cactcccctt ttaacctcac taggagtcac c	291
30	<210>	5	
	<211>	312	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	promotor CJ4	
35	<400>	5	

ES 2 614 891 T3

		actgggaggg taggggtcac gctgaattag caggtcacat cctgttgctt gagctggcgg	60
		ttaccctcct aggatccgag atgattcttg tagaggacta acgtccgcac aaatcttcgg	120
		cgggatgctc aaatcaccct tagctggttt gaaaaatccg tggcataaat ctaggatcgt	180
		gtaactggca cgaaaagaaa gcgtcatcgg cgcttgggaa catcttttta agatattcct	240
		caagtgccgt gacatctgtc aaccccgtag ctgcgagagt cgtagtcaca atgaagtcca	300
		ggaggacata ca	312
5	<210>	6	
	<211>	249	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
10	<220>		
	<223>	promotor CJ5	
	<400>	6	
		tcggacatat acggatttac ctgctgcaat cgcgccggcc ctgctcgaa attgcgtgaa	60
		ttttagtctg attgtgttg aatatccgca gaatgtgtgg gtttgctttt ataaatctgc	120
		gcagtgtagg gaacctcggc actatcggca gtgtcggaga aacttcctcg atataaatct	180
		ttgaagtaat tctcccaggc aatagctttt gacgtactcc gcttccaac tttttaggag	240
		acaactacc	249
15	<210>	7	
	<211>	332	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
20	<220>		
	<223>	promotor CJ6	
	<400>	7	
		ggcttcatcg tcgtctttga tccgatgcga gtccattaac ccaaactcct taaagcccgt	60
		aaaacggggg tattccaaca cggttatcca cagtttaacc attattcggg ggtaatccta	120
		acccaaatca ttacggaaac tccaatctgg ctcaaatat cctccatgat tctagggaca	180
		cccaatcagg tgcacccgct tccgtcgaca acgagtcaaa ctcggaag ccctcaacct	240
		gtcgggtctag aatatatata ccgccgggtc tagtggtgtg gtgtacacta acgataaacc	300
25		aacaaagtta tctattaaga ggaggccatt tc	332
30	<210>	8	
	<211>	318	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	promotor CJ7	

ES 2 614 891 T3

<400> 8

agaaacatcc cagcgctact aataggggagc gttgaccttc cttccacgga ccggtaatcg 60

gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgcgg ccgggtaatg 120

catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct 180

cctttctggt tttaatcaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac 240

agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc 300

caacgaaagg aaacactc 318

5 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo para D-psicosa 3-epimerasa

<400> 9
 aaaactgcag atgaaacacg gcatcta 27

15 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

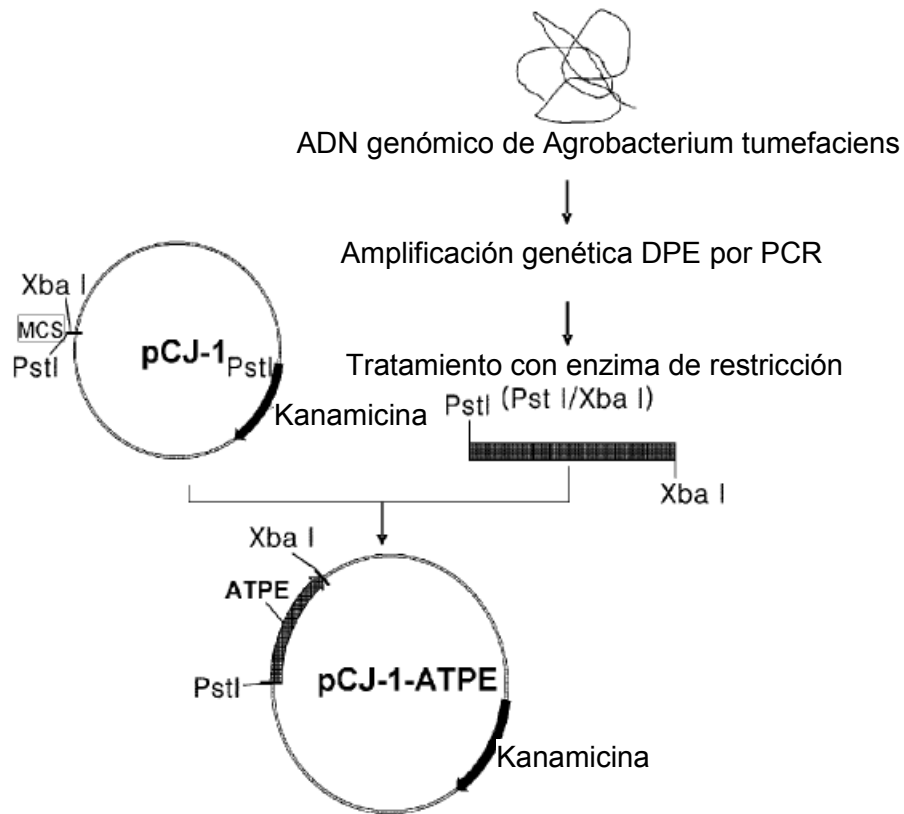
20 <220>
 <223> Cebador inverso para D-psicosa 3-epimerasa

<400> 10
 25 ctagtctaga tcagccacca agaacgaag 29

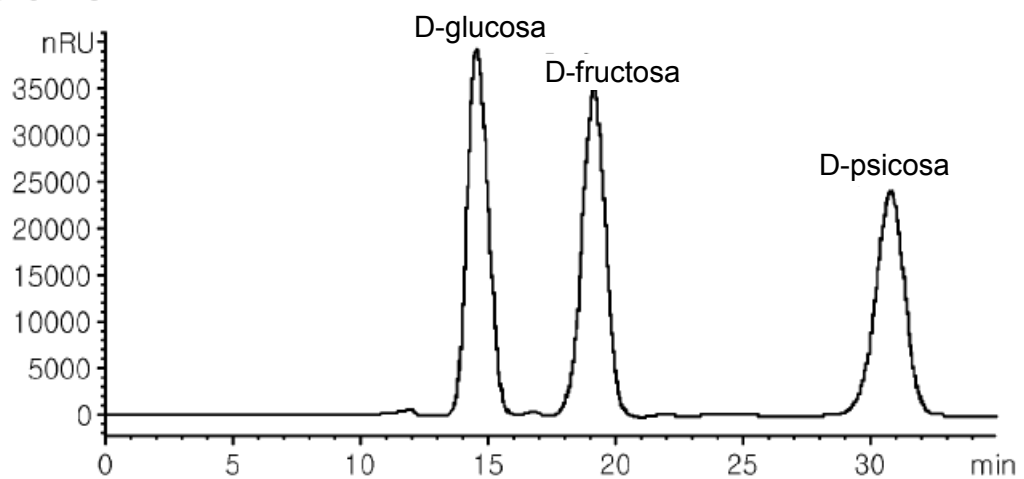
Reivindicaciones

1. Método para preparar D-psicosa a partir de D-fructosa mediante el uso de una psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y expresada en una cepa GRAS (*Generally Recognized as Safe* - generalmente considerada inocua), siendo la cepa GRAS de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046,
5
que incluye los pasos de: expresar la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* en una cepa GRAS; y preparar D-psicosa a partir de D-fructosa utilizando la psicosa-epimerasa expresada contenida en un cultivo de la cepa GRAS, inmovilizada sobre un soporte.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
10
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso de preparar D-psicosa incluye el paso de inmovilizar la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa sobre un soporte.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el soporte es alginato de sodio.
5. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque incluye además los pasos de empaquetar una columna con el soporte sobre el que está inmovilizada la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa y suministrar una solución de D-fructosa a la columna empaquetada.
15
6. Método para preparar D-psicosa a partir de D-glucosa, que incluye el paso de inmovilizar una psicosa-epimerasa y una D-glucosa isomerasa sobre soportes, donde la psicosa-epimerasa se deriva de *Agrobacterium tumefaciens* y se expresa en una cepa GRAS (*Generally Recognized as Safe* - generalmente considerada inocua), donde la cepa GRAS es de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046, y donde la psicosa-epimerasa está contenida en un cultivo de la cepa GRAS, inmovilizada sobre un soporte.
20
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque la cepa GRAS es una cepa transformada con un vector recombinante que incluye un gen codificador de una psicosa-epimerasa.
8. Método según una de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado porque la psicosa-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
25
9. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el soporte es alginato de sodio.
10. Método según una de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado porque incluye además los pasos de empaquetar una columna con los soportes sobre los que están inmovilizadas la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa y suministrar una solución de D-fructosa a la columna empaquetada con los soportes.
30
11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque cada uno de los soportes sobre los que están inmovilizadas la cepa GRAS que expresa la psicosa-epimerasa y la D-glucosa isomerasa, respectivamente, se empaqueta en una columna independiente, y las dos columnas se conectan en comunicación entre sí.
35
12. Cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046 para su uso en la preparación de D-psicosa a partir de D-fructosa o D-glucosa.

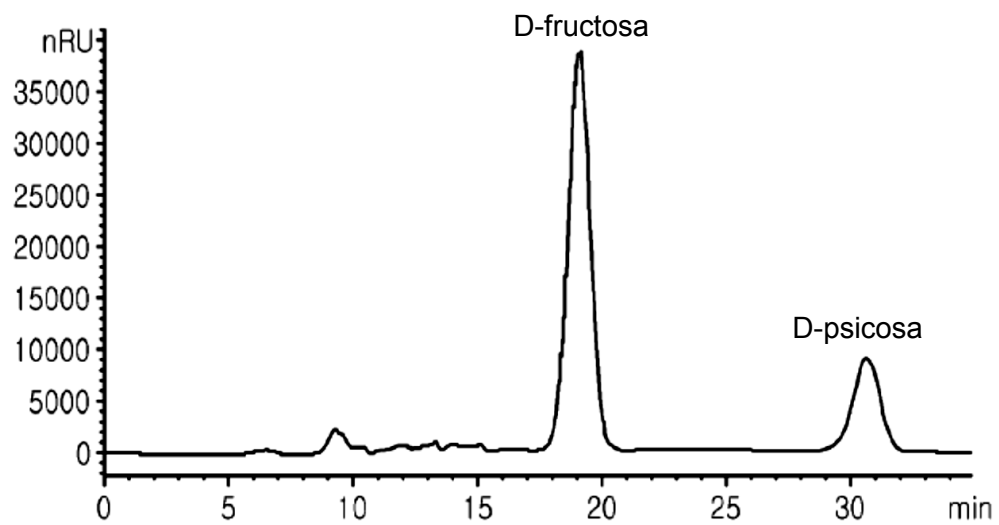
[Fig. 1]



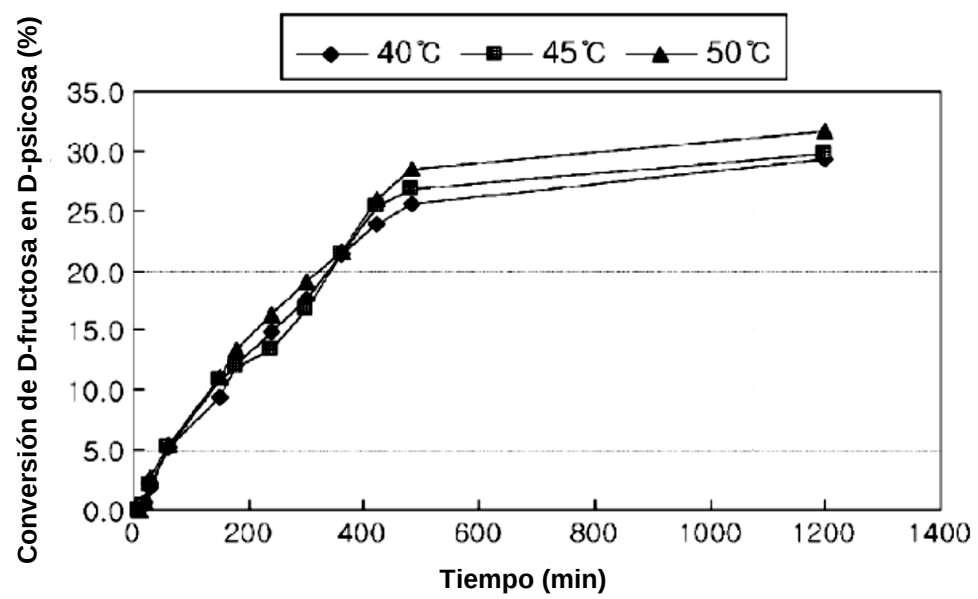
[Fig. 2a]



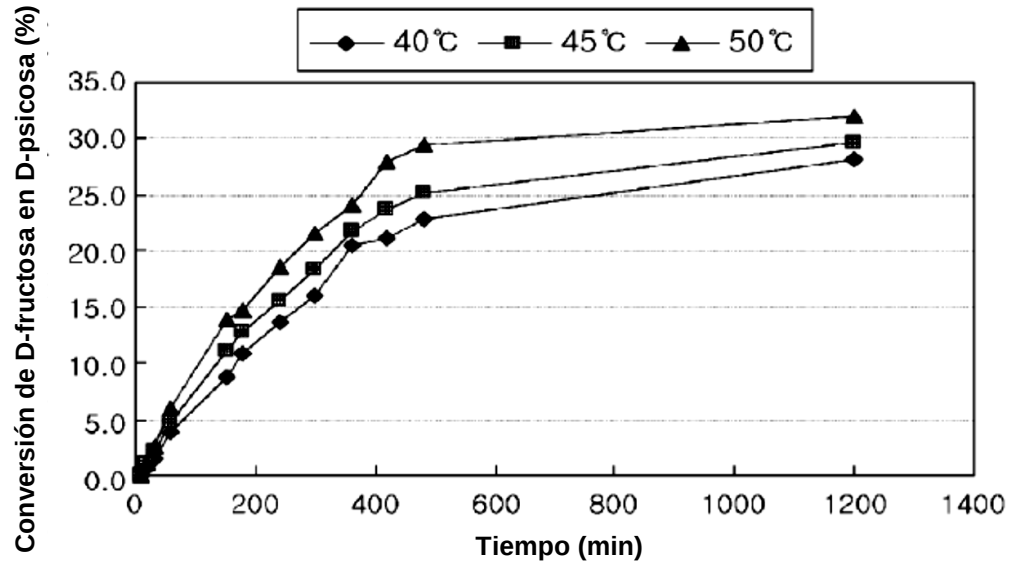
[Fig. 2b]



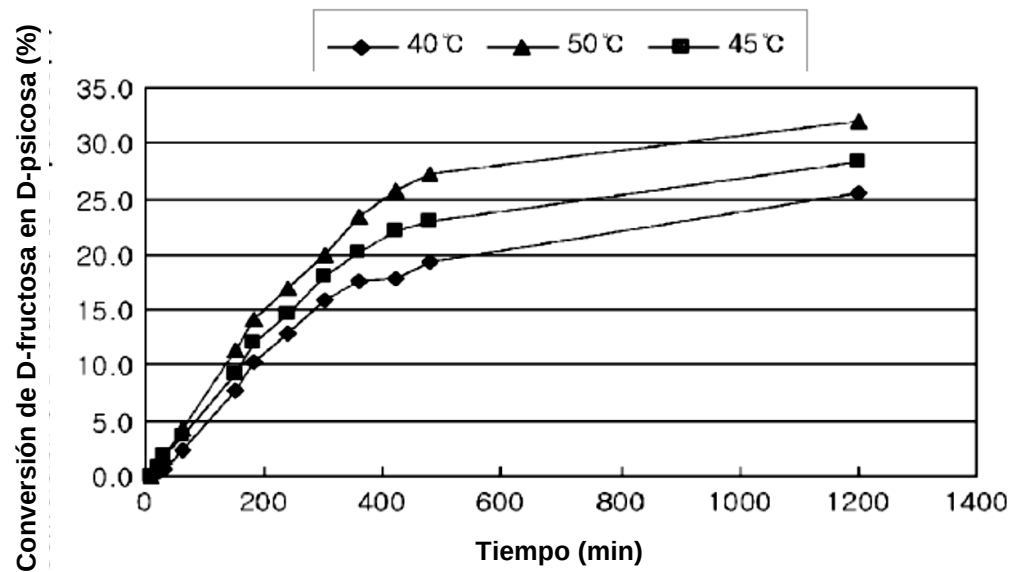
[Fig. 3a]



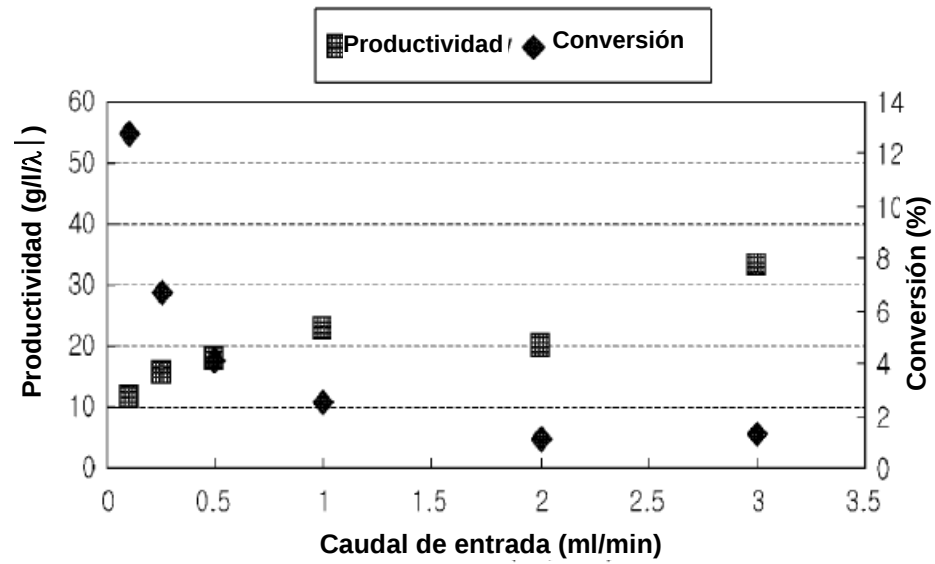
[Fig. 3b]



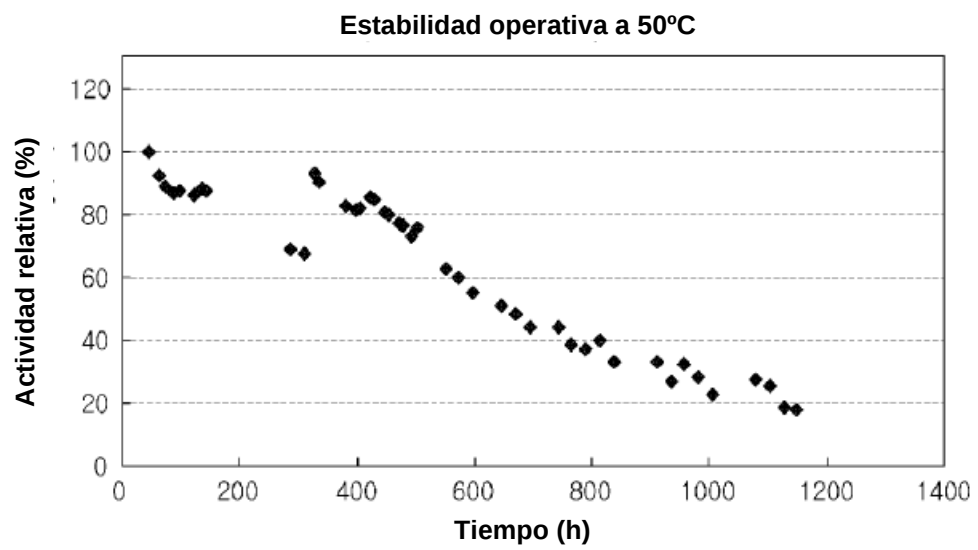
[Fig. 3c]



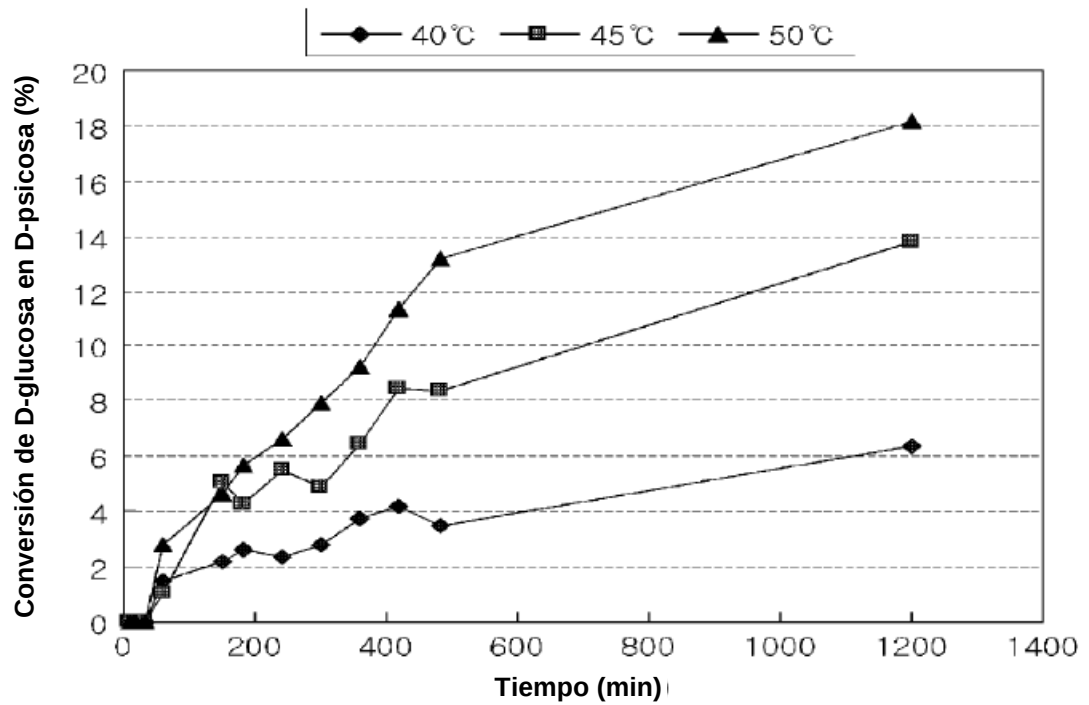
[Fig. 4]



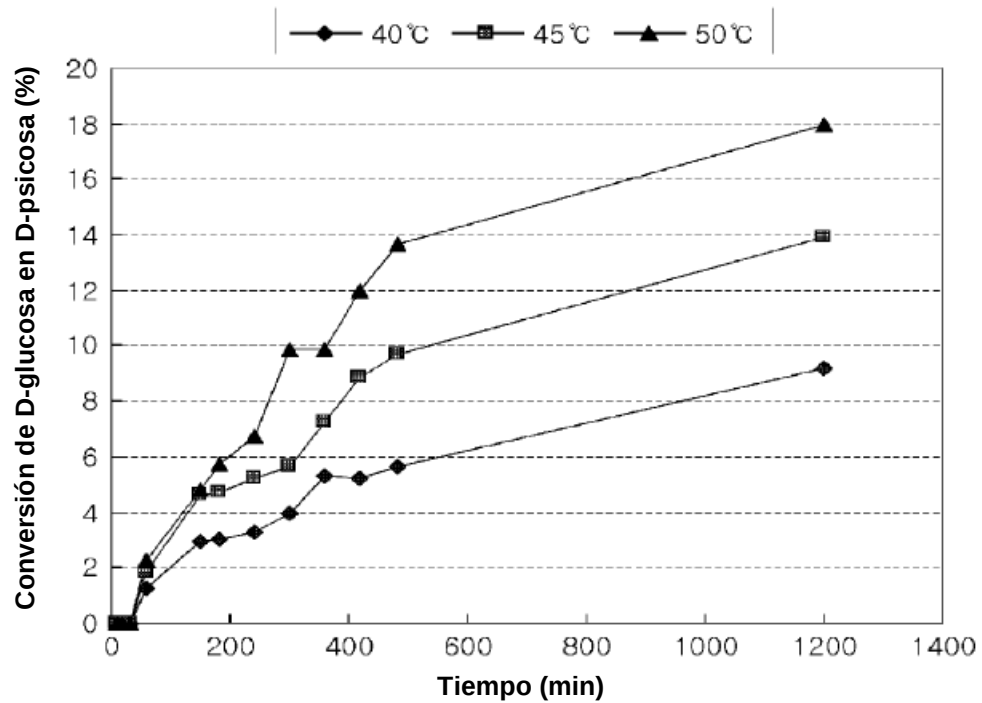
[Fig. 5]



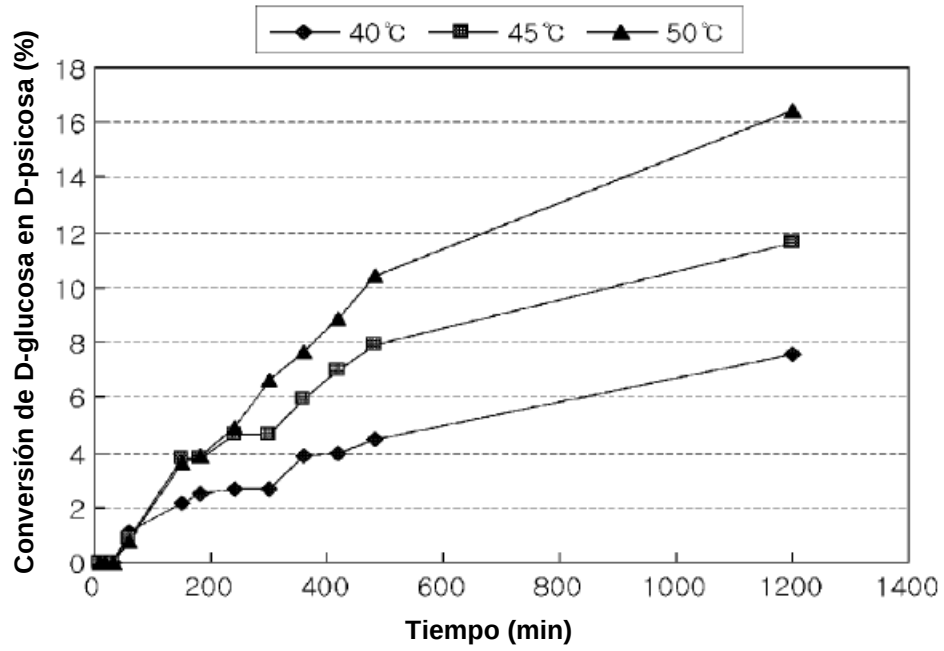
[Fig. 6a]



[Fig. 6b]



[Fig. 6c]



[Fig. 7]

