

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 501**

51 Int. Cl.:

C12N 9/92 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2012** **PCT/KR2012/006637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013** **WO13027999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2012** **E 12826072 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2749645**

54 Título: **D-psicosa 3-epimerasa mutante con estabilidad térmica mejorada, y producción continua de D-psicosa utilizando la misma**

30 Prioridad:

24.08.2011 KR 20110084712

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

25.07.2017

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu
Seoul 100-749, KR

72 Inventor/es:

KIM, YANG HEE;
KIM, JIN HA;
LEE, YOUNG MI;
HONG, YOUNG HO;
KIM, MIN HAE;
KIM, SEONG BO;
PARK, SEUNG WON;
OH, SEUNG HYUN;
OH, DEOK KUN y
CHOI, JIN GEUN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 626 501 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

D-psicosa 3-epimerasa mutante con estabilidad térmica mejorada, y producción continua de D-psicosa utilizando la misma

Campo Técnico

La presente invención se refiere a una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y un método de producción de D-psicosa utilizando la misma.

Técnica antecedente

La D-psicosa es un monosacárido conocido como un azúcar raro debido a que se encuentra escasamente en materiales naturales o está presente en pequeñas cantidades. La D-psicosa tiene una densidad energética ultra baja y su sabor dulce es similar al azúcar, y por lo tanto se utiliza ampliamente como un edulcorante funcional.

La D-psicosa es un epímero de fructosa y tiene un grado de dulzor y sabor muy similar a la fructosa. Sin embargo, a diferencia de la fructosa, la D-psicosa apenas se metaboliza en el cuerpo y por lo tanto tiene casi cero calorías. La D-psicosa se puede utilizar como un ingrediente eficaz para alimentos de dieta ya que la D-psicosa tiene la capacidad de inhibir la actividad de una enzima implicada en la síntesis de lípidos y reducir la obesidad abdominal. Además, Los azúcares alcohólicos tales como xilitol, y similares que se utilizan ampliamente como sustitutos de azúcar pueden tener efectos secundarios tales como que producen diarrea en el caso de un sobre consumo. Por el contrario, la D-psicosa se conoce por no tener sustancialmente 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., y 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:S127).

Por dicha razón, la D-psicosa atrae una atención entusiasta como edulcorante de dieta, y hay una creciente necesidad de desarrollar un método para producir D-psicosa eficazmente en la industria alimentaria. Como ha aumentado la necesidad de desarrollar la D-psicosa, se han llevado a cabo muchas investigaciones para producir D-psicosa a partir de fructosa utilizando métodos biológicos convencionales. Como enzimas capaces de convertir la fructosa en D-psicosa, se conocen la D-psicosa 3-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y D-tagatosa 3-epimerasa derivada de *Pseudomonas cichorii* o *Rhodobacter sphaeroides*. La D-psicosa 3-epimerasa se conoce por tener una actividad mayor que la D-tagatosa 3-epimerasa.

Las cepas que pertenecen al género *Corynebacterium* son microorganismos industriales que produce materiales químicos incluyendo L-lisina, L-treonina y varios ácidos nucleicos que tienen diversos usos en piensos forrajeros, productos farmacéuticos, alimentos y similares. Dichas cepas del género *Corynebacterium* son cepas GRAS (Reconocidas Generalmente como Seguras), y tienen propiedades que son fáciles de modificarse genéticamente y cultivarse en masa. Además, las cepas del género *Corynebacterium* tienen una alta estabilidad en distintas condiciones del procedimiento y una estructura de membrana celular relativamente fuerte en comparación con otras bacterias. Por estas razones, las cepas tienen propiedades biológicas que como que las células bacterianas existen en un estado estable bajo una alta presión osmótica debido a una alta concentración de azúcar y similares.

Documentos de la técnica anterior

- 1) Patente coreana N° 10-0744479 B1 (publicada el 1 de agosto de 2007)
- 2) Publicación de patente coreana N° 10-2011-0035805A (publicada el 6 de Abril 6 de 2011)
- 3) Wanmeng et al., J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 7785-7792 desvela la clonación, expresión y caracterización de la actividad enzimática de una D-Psicosa 3-Epimerasa (DTEasa) de *Clostridium cellulolyticum* H10. Particularmente, dicha enzima se investiga y se compara con otras enzimas tales como la DTEasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

Divulgación

Problema técnico

Los presentes inventores eran conscientes de los problemas de la D-psicosa 3-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* que tenía poca utilidad debido a su baja termoestabilidad a pesar de su alta actividad, y desarrollaron una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada de manera que la D-psicosa atrae actualmente una gran atención como un importante material alimentario que se puede producir industrialmente a gran escala, proporcionando de esta manera un método para producir continuamente D-psicosa utilizando dicha variante. Basándose en dicha investigación, los presentes inventores han llegado a la presente invención.

Específicamente, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada sustituyendo un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre.

- 5 Una realización de la presente invención también tiene el objetivo de proporcionar un vector de expresión recombinante que incluye un gen de la variante de D-psicosa 3-epimerasa y una cepa recombinante transformada con el vector de expresión recombinante.

- 10 Además, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar un reactor de lecho empaquetado que utiliza la variante de D-psicosa 3-epimerasa inmovilizada o la cepa recombinante, y un método para producir continuamente D-psicosa utilizando el reactor inmovilizado.

La invención se define en las reivindicaciones.

15 Solución técnica

- La presente descripción proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada sustituyendo un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre. Además, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que incluye un gen de la variante de D-psicosa 3-epimerasa, y una cepa recombinante transformada con el vector de expresión recombinante. Además, la presente descripción proporciona un reactor inmovilizado que se prepara utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa o la cepa recombinante, y un método para producir continuamente D-psicosa utilizando el reactor inmovilizado.

- 25 Más específicamente, una realización de la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A (Fig. 5) o un fragmento funcional en el que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), o una secuencia de aminoácidos en la que la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye por una cisteína.

- Otra realización de la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional en el que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye por un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), y la serina (Ser) en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye por cisteína.

- Otra realización más de la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que incluye un gen que codifica la variante de D-psicosa 3-epimerasa.

Otra realización más de la presente invención proporciona *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 transformada con el vector de expresión recombinante.

- 45 Otra realización más de la presente invención proporciona un método para producir D-psicosa a partir de fructosa utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa.

Otra realización más de la presente invención proporciona un método para producir D-psicosa a partir de fructosa utilizando el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 recombinante.

- 50 Otra realización más de la presente invención proporciona un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que comprende una columna cargada con una perla en la que se inmoviliza la variante de D-psicosa 3-epimerasa.

- Otra realización más de la presente invención proporciona un método para producir D-psicosa introduciendo una solución de fructosa en el reactor inmovilizado.

Efectos ventajosos

- 60 La presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa en la que el aminoácido en una posición específica de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre se ha sustituido. La variante de D-psicosa 3-epimerasa de la invención tiene las ventajas de que la variante tiene una termoestabilidad significativamente mejorada a la vez que mantiene su actividad enzimática, permitiendo de esta manera que la D-psicosa actualmente atraiga una gran atención como un material alimentario importante que se va a producir más eficazmente e industrialmente a gran escala.

65

Específicamente, la variante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la presente invención tiene una semivida sorprendentemente extensa a la temperatura de reacción enzimática general en comparación con una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre, permitiendo de esta manera que la D-psicosa 3-epimerasa que se prepara se utiliza durante mucho tiempo en la producción de D-psicosa. Por lo tanto, la variante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la presente invención puede reducir el tiempo de producción y el coste, mejorando de esta manera la eficacia de producción.

Además, la presente invención proporciona un vector recombinante para su uso en la expresión de la variante de D-psicosa 3-epimerasa, y una cepa recombinante, el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 transformado con el vector de expresión recombinante de la invención. Por lo tanto, la presente invención tiene la ventaja de proporcionar un método para producir continuamente D-psicosa a gran escala formando un reactor inmovilizado utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa o la cepa recombinante.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un vector de expresión recombinante que incluye un gen de variante de D-psicosa 3-epimerasa derivado de *Agrobacterium tumefaciens*.

La Fig. 2 es un gráfico que representa un perfil de temperatura de fusión aparente de D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y variantes (S213C, I33L, e I33L-S213C) derivadas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando DSC (calorímetro de exploración diferencial). La parte del pico del gráfico representa una temperatura de fusión aparente de la enzima.

La Fig. 3 representa fotografías de los resultados del modelado molecular de D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y variantes (S213C, I33L, e I33L-S213C) derivadas de *Agrobacterium tumefaciens* (a) y (b) representan una estructura secundaria del tipo silvestre y la variante I33L-S213C, respectivamente. (c) y (d) representan los enlaces hidrógeno estimados que rodean el aminoácido de la posición 213 (serina (Ser) en el caso del tipo silvestre y un a cisteína (Cys) en el caso de la variante S213C de la secuencia de aminoácidos dl tipo silvestre y variante S213C, respectivamente. (e) y (f) representan las interacciones entre los grupos aromáticos del tipo silvestre y la variante I33L, respectivamente.

La Fig. 4 es un gráfico que representa la estabilidad de operación a una temperatura de reacción de 50 °C de un reactor inmovilizado utilizando variantes en un método de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 5 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A (D-psicosa 3-epimerasa tipo silvestre).

Modo para la invención

La presente descripción proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con una termoestabilidad mejorada sustituyendo un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácido de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre. Además, la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional en el que la isoleucina (Ile) en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), o una secuencia de aminoácidos en la que la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con cisteína. Además, la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional en la que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácido se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), y la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácido se sustituye con cisteína. Además, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que incluye un gen de la variante de D-psicosa 3-epimerasa, y una cepa recombinante transformada con el vector de expresión recombinante. Además, la presente invención proporciona un reactor inmovilizado para producir una D-psicosa que comprende una columna cargada con un vehículo al que se une la variante de D-psicosa 3-epimerasa, y un método para producir una D-psicosa introduciendo una solución de fructosa en el reactor inmovilizado. Además, la presente descripción proporciona un reactor inmovilizado que se prepara utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa o la cepa recombinante, y un método para producir continuamente D-psicosa utilizando el reactor inmovilizado.

De aquí en adelante, se describirán realizaciones de la presente invención con más detalle. Las descripciones o detalles evidentes para un experto que tiene un conocimiento habitual en la técnica o campo relevante se omitirán en el presente documento.

Una realización de la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con una termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional en la que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), o una secuencia de aminoácidos en la que la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con cisteína.

El *Agrobacterium tumefaciens* es una cepa bien conocida, y el *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 33970 se puede utilizar como un ejemplo.

De acuerdo con la invención, la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre, derivada de *Agrobacterium tumefaciens*, tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A (Fig. 5) o un fragmento funcional de la misma. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento funcional" puede hacer referencia a un fragmento que incluye mutaciones debido a una sustitución, una inserción o una eliminación de aminoácidos parciales de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que tiene la actividad de convertir la fructosa en D-psicosa.

La variante de D-psicosa 3-epimerasa se refiere a una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se sustituye un aminoácido en una posición específica de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre derivada de *Agrobacterium tumefaciens*.

La variante de D-psicosa 3-epimerasa representa que la isoleucina de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con leucina.

Otra realización de la presente invención proporciona una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional en el que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), y la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con cisteína.

Más preferentemente, la variante de D-psicosa 3-epimerasa representa que la isoleucina de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con leucina, y la serina de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con cisteína.

Otra realización más de la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que incluye un gen de variante de D-psicosa 3-epimerasa (Fig. 1).

Otra realización más de la presente invención proporciona el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 transformado con el vector de expresión recombinante.

La cepa recombinante *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 se depositó con el número de acceso KCCM 11204P en la KCCM (Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos) localizado en Hongje 1-dong, Seodaemun-ku, Seúl, Corea el 18 de agosto de 2011 de acuerdo con el tratado de Budapest.

Otra realización más de la presente invención proporciona un método para producir D-psicosa a partir de fructosa utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa o el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 recombinante.

Otra realización más de la presente invención proporciona un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que comprenden una columna cargada con una perla en la que está inmovilizada la variante de D-psicosa 3-epimerasa o el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 recombinante.

La expresión "reactor inmovilizado" se refiere a un reactor en el que se lleva a cabo la reacción para producir la D-psicosa por una cepa encapsulada en una perla de alginato, o mediante una columna cargada con una cepa o una enzima encapsulada en una perla de alginato. A saber, la inmovilización significa que una sustancia que proporciona una actividad biológica, en este caso, la D-psicosa 3-epimerasa o una cepa que incluye la misma está inmovilizada en un vehículo.

Como vehículo para inmovilizar la variante de enzima o la cepa recombinante, se puede utilizar cualquiera de los vehículos capaces de utilizarse para la inmovilización de enzimas o cepas en la técnica relacionada sin limitación. Preferentemente, se puede utilizar el alginato sódico.

El alginato sódico es un polisacárido coloidal natural que se encuentra abundantemente en las membranas celulares de algas y consiste en ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico. El alginato sódico forma enlaces beta-1,4 aleatoriamente en términos de contenido y se pueden utilizar ventajosamente para la inmovilización de cepas o enzimas.

Otra realización más de la presente invención proporciona un método para producir D-psicosa introduciendo una solución de fructosa en el reactor inmovilizado.

El término "semivida" como se utiliza en el presente documento se refiere al periodo que se necesita para que la actividad relativa de la reacción enzimática inicial de una enzima o una variante de enzima se reduzca a 50, cuando la actividad relativa de la reacción enzimática inicial de la enzima o variante de enzima se asume que es de 100.

La expresión "estabilidad de operación" como se utiliza en el presente documento se refiere a un estado en el que un reactor se puede operar mientras se mantiene una productividad adecuada para producir continuamente un producto deseado (en la presente invención, la D-psicosa) en comparación con la actividad inicial. La estabilidad de operación habitualmente se representa por el tiempo operacional (unidades de tiempo y similares).

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos, y ejemplos comparativos. Se debería entender que estos ejemplos se proporcionan solo para ilustración y no se consideran de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Medición de la actividad de la D-psicosa 3-epimerasa

La actividad de la D-psicosa 3-epimerasa se midió utilizando fructosa como sustrato de D-psicosa 3-epimerasa o se añadió una muestra que comprendía D-psicosa 3-epimerasa a una solución tampón de 50 mM de PIPES (piperazina-N,N'-bis (ácido 2-etanosulfónico)) que contenía 20 mM de sustrato, pH 8,0, seguido por una reacción a 50 °C durante 10 minutos. A la reacción que había reaccionado, se añadió ácido clorhídrico de manera que la concentración final era de 200 mM para parar la reacción. Se midieron las concentraciones de fructosa y D-psicosa utilizando una HPLC equipada con un detector RI (Índice de refracción). El análisis HPLC se llevó a cabo con la condición de que se inyectaba una muestra en un equipo de columna a 80 °C (columna BP-100 Ca²⁺ carbohidrato), se traspasó con agua destilada como fase móvil a una velocidad de 0,5 ml/min. La unidad enzimática se define como una cantidad que produce 1 mmol de D-psicosa por minuto en condiciones de pH 8,0 y 50 °C.

Ejemplo 1

Preparación de la variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada por mutagénesis aleatoria

Se construyó una biblioteca de variantes de D-psicosa 3-epimerasa utilizando, como matriz, la D-psicosa 3-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 33970 (que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1 desvelada en la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A, (Fig. 5) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa que tiende a errores (PCR tendente a error).

Específicamente, se empleó un típico kit de mutagénesis por PCR que produce dos a tres mutaciones por 1000 pares de bases. Como cebador se utilizó un oligonucleótido, en el que se habían introducido los sitios de las enzimas de restricción NcoI y PstI, para ejecutar la reacción en cadena de polimerasa, construyendo de esta manera una biblioteca genética que codifica la variante de D-psicosa 3-epimerasa, que se insertó entonces en *E. coli* BL21.

El medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina se utilizó para cultivar *E. coli* BL21 que incluía un plásmido en el que se había introducido un gen de una variante de la D-psicosa 3-epimerasa, seguido por cultivo a 37 °C durante 6 horas. Se tomó una parte de la solución de cultivo, se transfirió a un medio que incluía 50 µg/ml de ampicilina y 0,1 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), y luego se cultivó a 37 °C durante 6 horas para inducir la expresión de la enzima. La solución de cultivo se trató por calor a 60 °C durante 5 minutos, seguido por la adición de fructosa de manera que la concentración final era de 15 mM, y luego se hizo reaccionar a 50 °C durante 30 minutos. Después, utilizando un kit de ensayo de fructosa general, se midió la cantidad de fructosa residual y se seleccionaron 150 variantes que tenían una actividad de aproximadamente 1,2 veces mayor que la enzima tipo silvestre comparando un total de 5000 variantes con la enzima de tipo silvestre.

Se indujeron las 150 variantes seleccionadas para que expresaran enzimas de nuevo de la misma manera que anteriormente. Las células cultivadas se sometieron a sonicación para destruir las células. Las células destruidas se centrifugaron para obtener un sobrenadante que comprendía D-psicosa 3-epimerasa. Después, se midió la actividad enzimática utilizando el "Método para medir la actividad de D-psicosa 3-epimerasa" mencionado anteriormente. Como resultado de la medición, se re-seleccionaron 23 variantes que presentaban una alta semivida a temperatura de reacción de 55 °C.

Los genes de las 23 variantes re-seleccionadas se transfirieron de pTrc99A a pET-24a(+), que se utilizó para transformar *E. coli* BL21. La cepa recombinante *E. coli* BL21 se cultivó en medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina a 37 °C. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,6, se añadió IPTG (Isopropil-beta-tiogalactopiranosido) de manera que la concentración final era 0,1 mM, seguido por el cultivo a 16 °C durante 16 horas. La solución de cultivo se centrifugó para recolectar los componentes bacterianos, que entonces se re-suspendieron en 50 mM de solución de tampón fosfato que incluía 300 mM de KCl y 10 mM de imidazol. La solución suspendida se sometió a ultrasonificación para aplastar las células. La solución celular destruida se centrifugó para recolectar un sobrenadante que incluía la D-psicosa 3-epimerasa, que entonces se purificó utilizando una cromatografía de afinidad de iones metálicos. Se retiró el imidazol de la enzima purificada empleando un cartucho de des-salado.

Se midió la semivida de las 23 variantes re-seleccionadas a 55 °C. Se seleccionaron las cinco variantes que presentaban la semivida más alta. La actividad relativa y la semivida a 55 °C de las 5 variantes seleccionadas y la enzima de tipo silvestre se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

D-psicosa 3-epimerasa	Actividad relativa (%)	Semivida (min)
Tipo silvestre	100 ± 0,5	10 ± 2,3
S8T	29 ± 0,5	15 ± 0,3
I33L	88 ± 3,3	64 ± 0,2
G67C	8 ± 0,0	132 ± 0,4
V96A	51 ± 0,5	18 ± 0,2
S213C	103 ± 0,4	28 ± 0,7

Como resultado, se determinaron que eran, en orden descendente, G67C > I33L > S213C > V96A > S8T. En vista de la semivida junto con la actividad enzimática, se identificaron dos variantes, I33L y S213C como las variantes más preferidas.

Los nombres de las variantes enzimáticas que se utilizaron en el presente documento se explicaron utilizando, como ejemplo, I33L. El número 33 significa que un aminoácido en la posición 33 de una secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre se ha sustituido, y las letras I y L a ambos lados del número significan la letra inicial de los aminoácidos, respectivamente. En suma, I33L significa que la isoleucina (Ile) en la posición 33 de una secuencia de aminoácidos de D-psicosa 3-epimerasa se ha sustituido con leucina (Leu).

Ejemplo 2

Preparación de la variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada utilizando un diseño racional

De manera similar que en el Ejemplo 1, se seleccionaron las variantes S213C y I33L como variantes que tenían una termoestabilidad mejorada sin reducción significativa de la actividad. Basándose en las variantes seleccionadas se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio en las posiciones de aminoácido 33 y 213 de la secuencia de aminoácidos.

Específicamente, la serina (Ser) en la posición 213 que tiene polaridad y no carga se sustituyó con treonina (Thr), cisteína (Cys) o metionina (Met) que tiene polaridad y no carga; una prolina (Pro) que es un aminoácido no polar; ácido glutámico (Glu) que tiene una carga negativa; y lisina (Lys) que tiene una carga positiva, respectivamente.

La isoleucina en la posición 33 que no tiene polaridad se sustituyó con cisteína que tiene polaridad y no carga; valina (Val), leucina o prolina que es no polar; ácido glutámico que tiene una carga negativa; y lisina que tiene una carga positiva, respectivamente.

Se midieron la actividad relativa y la semivida a 55 °C de las variantes, cuyos aminoácidos se sustituyeron como se menciona anteriormente, y de la enzima de tipo silvestre.

Como resultado, se obtuvieron las variantes I33L, I33C, I33V y S213C que tenían una termoestabilidad mejorada sin afectar la actividad de las enzimas. Además, la variante S213C se combinó con la variante I33L que era la variante más preferida en vista de la actividad enzimática y termoestabilidad entre las variantes que tenían un aminoácido sustituido en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos, obteniendo de esta manera una variante de D-psicosa 3-epimerasa (I33L-S213C) que tenía una actividad excelente y una termoestabilidad extraordinariamente mejorada.

La Tabla 2 resume la actividad relativa y la semivida a 55 °C de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre derivada de *Agrobacterium tumefaciens*, las variantes en las que se habían sustituido un aminoácido en la posición 33 o 213, y las variantes en las que se habían sustituido ambos aminoácidos de las posiciones 33 y 213.

Tabla 2

D-psicosa 3-epimerasa	Actividad relativa (%)	Semivida (min)
Tipo silvestre	100 ± 0,5	10 ± 2,3
I33L	88 ± 3,3	63 ± 0,2
I33C	83 ± 2,0	24 ± 0,6
I33V	92 ± 2,2	12 ± 0,4
I33E	ND	ND
I33K	ND	ND

D-psicosa 3-epimerasa	Actividad relativa (%)	Semivida (min)
I33P	ND	ND
S213C	103 ± 0,4	28 ± 0,7
S213P	95 ± 0,9	6 ± 0,2
S213T	68 ± 0,3	5 ± 0,1
S213M	22 ± 1,9	3 ± 0,3
S213E	19 ± 0,0	3 ± 0,1
S213K	ND	ND
I33L-S213C	74 ± 1,1	265 ± 2,3
ND: No detectable		

Ejemplo experimental comparativo 1

Comparación de la temperatura de fusión aparente de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y variantes de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con el Ejemplo 2.

Con el fin de determinar la termoestabilidad de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y las variantes de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con el Ejemplos 2, es decir, I33L, S213C y I33L-S213C, se midió la temperatura de fusión aparente (T_m) de cada enzima (o variante).

Como resultado se podía ver que la temperatura de fusión aparente, en orden ascendente era, tipo silvestre < S213C < I33L < I33L-S213C (Fig. 2). Específicamente, al compararse con el tipo silvestre, la temperatura de fusión aparente estaba aumentada en aproximadamente 4,3 °C en el caso de la variante S213C, y aproximadamente 7,6 °C en el caso de la variante I33L-S213C.

Ejemplo experimental comparativo 2

Comparación de tasa de reacción enzimática de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y las variantes de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con el Ejemplo 2

Con el fin de determinar la tasa de reacción enzimática de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y las variantes de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con el Ejemplo 2, a saber, I33L, S213C e I33L-S213C, se observaron los parámetros cinéticos de cada enzima (o variante) a una temperatura de reacción de 50 °C.

Los resultados de la medición se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

D-psicosa 3-epimerasa	K _m (mM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m
Tipo silvestre	44 ± 0,4	4338 ± 6	99 ± 0,9
S213C	42 ± 1,0	4194 ± 63	101 ± 3,0
I33L	40 ± 0,7	4240 ± 65	105 ± 2,5
I33L-S213C	31 ± 0,1	4135 ± 99	134 ± 3,2

Como resultado de la medición de los parámetros cinéticos de cada enzima, la enzima de tipo silvestre y las variantes I33L y S213C presentaban valores similares, mientras que la variante I33L-S213C presentaba una eficacia catalítica enzimática (k_{cat}/K_m) que era aproximadamente de 1,5 veces mayor que la de la enzima de tipo silvestre y las variantes I33L y S213C. Esto es debido a que I33L-S213C forma un enlace de hidrógeno adicional en comparación con las otras variantes o la enzima de tipo silvestre, y una nueva interacción acumulada de grupos aromáticos que no se encuentran en la enzima de tipo silvestre, formando de esta manera una estructura más dura y densa que a su vez aumenta la afinidad por el sustrato (Fig. 3).

Más específicamente, en vista de los resultados de modelado molecular, a diferencia de la enzima de tipo silvestre que tiene una serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos y una isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos, que no existen en el sitio activo sino en la superficie de la enzima, se descubrió que la I33L-S213C forma una interacción de superenrollamiento entre la cisteína de la posición 213 y la leucina (Leu) en la

posición 33 de la secuencia de aminoácidos (Fig. 3 (a), (b)). Se sabe que dicha interacción de superenrollamiento estabiliza la estructura de las proteínas.

Además, se sabe que la serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos de la enzima forma dos supuestos enlaces de hidrógeno. Sin embargo, para S213C donde la serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácido se sustituye con cisteína, se podía ver que los supuestos enlaces de hidrógeno estaban aumentados a seis [Fig. 3 (c), (d)], que se determinó que también hacían más densa la estructura de la proteína, contribuyendo al aumento de la termoestabilidad.

Además, en el modelado molecular, la enzima de tipo silvestre parece que no tiene interacciones entre los grupos aromáticos. Por el contrario, se podía ver que la variante I33L presentaba interacciones acumuladas entre los grupos aromáticos (Fig. 3 (e), (f)). Se determinó que la interacción acumulada entre grupos aromáticos es un factor de aumento de la termoestabilidad.

Ejemplo 3

Preparación y cultivo de una cepa recombinante transformada con un vector recombinante que incluye un gen de la variante I33L-S213C de acuerdo con el Ejemplo 2

(1) Preparación de la cepa recombinante

Se amplificó un gen que codifica la D-psicosa 3-epimerasa mediante una reacción en cadena de polimerasa utilizando el ADN de la variante I33L-S213C de acuerdo con el Ejemplo 2 como matriz y un oligonucleótido en el que se introdujeron secuencias de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción PstI y XbaI como cebador. Con el fin de expresar la D-psicosa 3-epimerasa codificada por el gen amplificado a gran escala, se construyó un vector de expresión pFIS-1-ATPE-2 recombinante (Fig. 1) insertando el producto PCR amplificado cortado por las enzimas de restricción PstI y XbaI en un vector lanzadera pCJ-1 (depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM), que es un depósito internacional, el 8 de noviembre de 2004 con el número de acceso KCCM-10611) derivado de una bacteria perteneciente al género *Corynebacterium*.

El vector de expresión recombinante se introdujo en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 por transformación utilizando electroporación para preparar una cepa recombinante capaz de expresar un gen que codificaba D-psicosa 3-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*.

La cepa recombinante se denominó *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 18 de agosto de 2011 con el número de acceso KCCM 11204P.

(2) Cultivo de la cepa recombinante

La cepa recombinante que se obtiene en (1) anteriormente se inoculó en un medio MB que contenía 10 µg/ml de kanamicina (10 g/l de Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de Bacto-levadura, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de Soytone) con una concentración inicial de $DO_{600} = 0,1$ seguido por el cultivo a 30 °C durante 24 horas para inducir la expresión de variantes de D-psicosa 3-epimerasa. La solución de cultivo obtenida se inoculó en un fermentador cargado con un medio de mutación (8 g/l de glucosa, 20 g/l de soytone, 10 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 1,2 g/l de KH_2PO_4 , 1,4 g/l de $MgSO_4$) que contenía 10 µg/ml de concentración de kanamicina a $DO_{600} = 0,6$, y se cultivó a 30 °C durante 20 horas.

Ejemplo 4

Inmovilización de la cepa recombinante de acuerdo con el Ejemplo 3 y preparación continua de D-psicosa mediante el reactor inmovilizado

Tras el cultivo de la cepa recombinante de acuerdo con el Ejemplo 3, las células bacterianas se recolectaron por centrifugación de la solución de cultivo. Las células recolectadas se suspendieron en 50 mM de solución de tampón EPPS (pH 8,0) de manera que la concentración de las células recolectadas era del 20 %. Las células bacterianas de la cepa recombinante suspendida se añadieron a una solución acuosa del 2 % (v/v) de alginato sódico. La solución mixta se añadió gota a gota en 100 mM de $CaCl_2$ mediante una bomba con jeringa y una bomba de vacío para generar el conjugado células bacterianas-alginato donde las células bacterianas se atraparon en una perla de alginato sódico. La D-psicosa se preparó continuamente utilizando un reactor inmovilizado formado cargando una columna de lecho empaquetado con la cepa recombinante inmovilizada en alginato sódico.

Ejemplo experimental comparativo 3

Comparación de la estabilidad de operación de un reactor inmovilizado utilizando una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y un reactor inmovilizado de acuerdo con el Ejemplo 4

Con el fin de medir la estabilidad de operación de un reactor inmovilizado utilizando una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre y un reactor inmovilizado de acuerdo con el Ejemplo 4, la temperatura de reacción se fijó a 50 °C, y en los respectivos reactores, se preparó la D-psicosa continuamente durante dos meses, y luego se midió la actividad de D-psicosa. La concentración de fructosa era de 480 g/l y el caudal era de 850 ml/h.

5 Como resultado, al compararse con un reactor inmovilizado que utiliza el tipo silvestre, se podía ver que el reactor inmovilizado que utiliza variantes con termoestabilidad mejorada y actividad enzimática mantenían una estabilidad de operación alta durante más de dos meses. Específicamente, el reactor inmovilizado que utiliza el tipo silvestre presentaba una semivida de aproximadamente 30 días de semivida, mientras que el reactor inmovilizado que utiliza la variante I33L-S213C presentaba una semivida de aproximadamente 77 días (Fig. 4).

10 Por lo tanto, se espera que las enzimas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar durante mucho tiempo, reduciendo de esta manera los costes de producción de la D-psicosa.

15

REIVINDICACIONES

1. Una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional, en la que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), o una secuencia de aminoácido en la que la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con cisteína.
2. Una variante de D-psicosa 3-epimerasa con termoestabilidad mejorada, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente Coreana N° 10-2011-0035805A o un fragmento funcional, en la que la isoleucina (Ile) de la posición 33 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con un aminoácido que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucina (Leu), cisteína (Cys) y valina (Val), y la serina (Ser) de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos se sustituye con cisteína.
3. Un vector de expresión recombinante que comprende un gen que codifica la variante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Un *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 transformado con el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Un método de producción de D-psicosa a partir de fructosa utilizando la variante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
6. Un método de producción de D-psicosa a partir de fructosa utilizando el *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-ATPE-2 recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que comprende una columna cargada con un vehículo en el que se inmoviliza la variante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
8. Un método de producción de D-psicosa introduciendo una solución de fructosa en el reactor inmovilizado de acuerdo con la reivindicación 7.

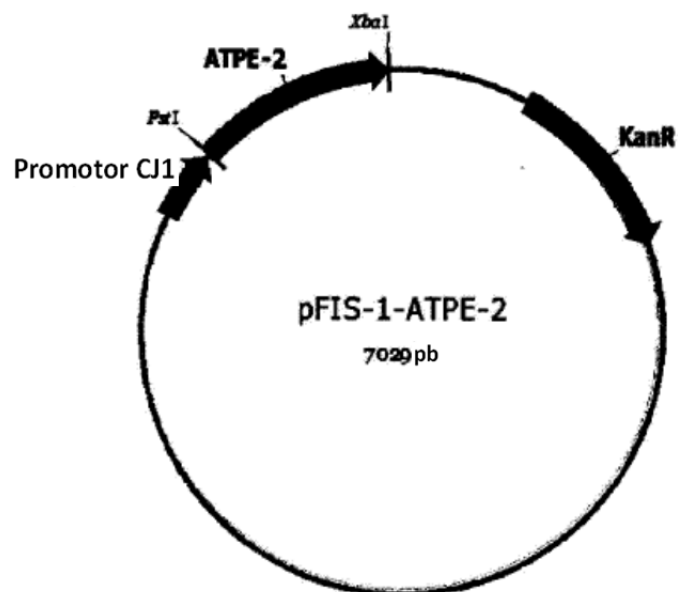


FIG.1

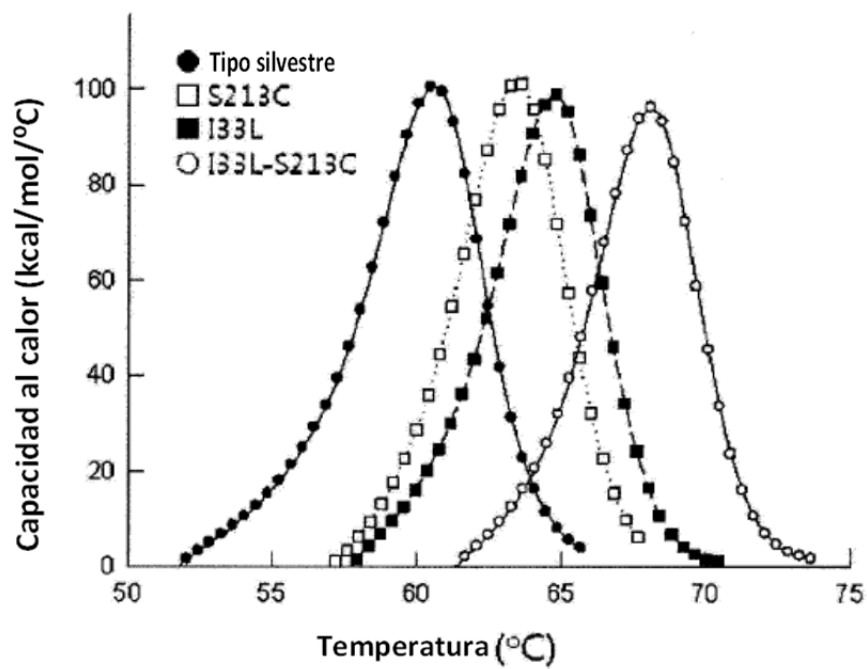


FIG.2

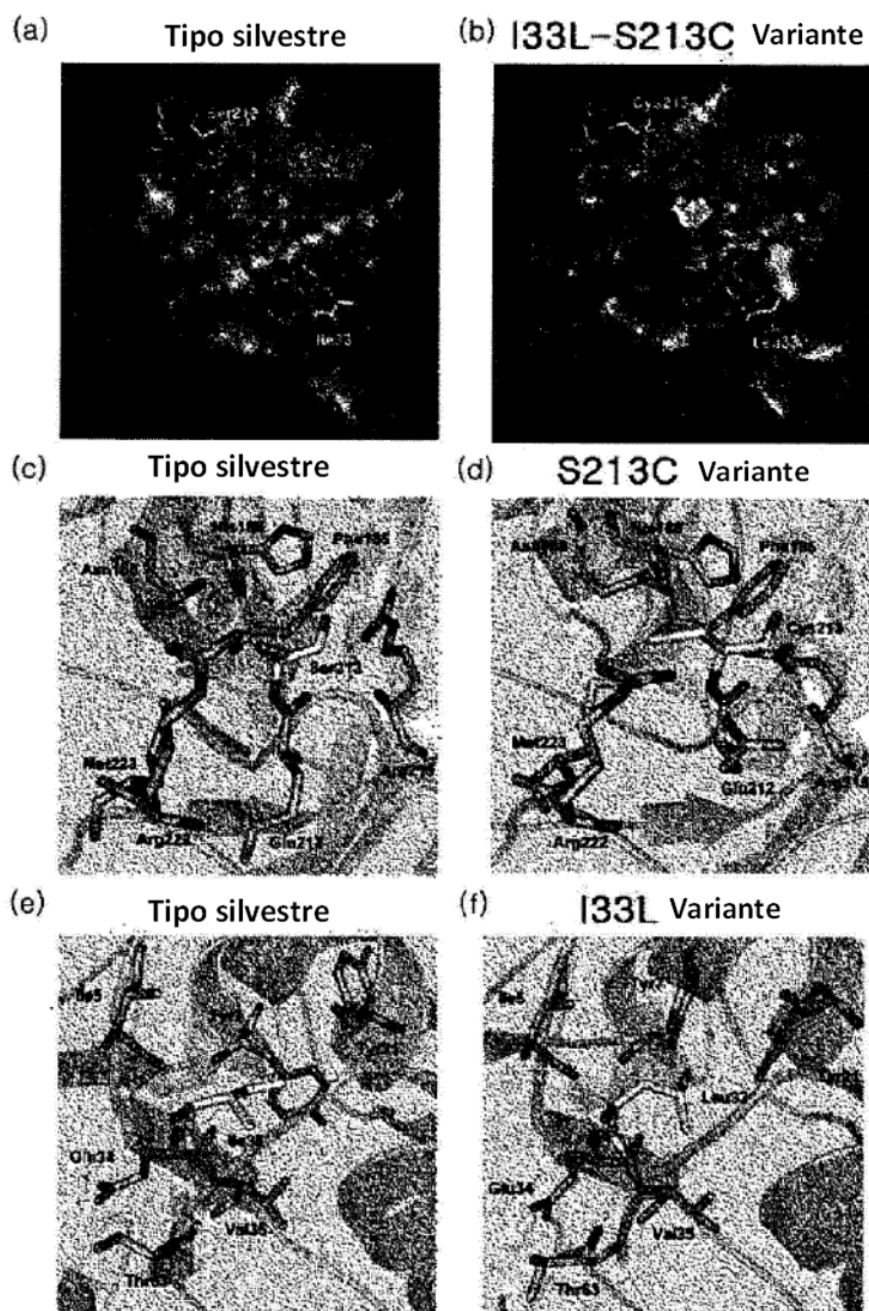


FIG.3

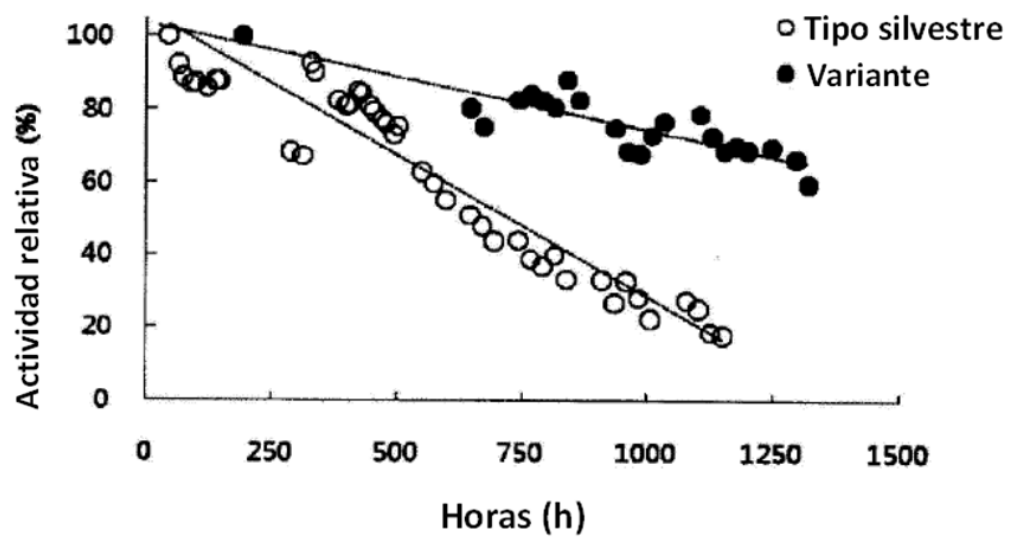


FIG.4

<210> 1
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> D-psicosa 3-epimerasa de Agrobacterium tumefaciens

 <400> 1
 Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
 12 16 21 26

 Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
 31 36 41

 Ile Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
 46 51 56

 Ala Thr Ile Arg Lys Ser Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala
 61 66 71

 Gly Ile Gly Pro Ser Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ala Ala
 76 81 86 91

 Val Arg Ala Ala Gly Lys Ala Phe Phe Glu Arg Thr Leu Ser Asn Val
 96 101 106

 Ala Lys Leu Asp Ile His Thr Ile Gly Gly Ala Leu His Ser Tyr Trp
 111 116 121

 Pro Ile Asp Tyr Ser Gln Pro Val Asp Lys Ala Gly Asp Tyr Ala Arg
 126 131 136

 Gly Val Glu Gly Ile Asn Gly Ile Ala Asp Phe Ala Asn Asp Leu Gly
 141 146 151

 Ile Asn Leu Cys Ile Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Asn His Tyr Leu
 156 161 166 171

 Asn Thr Ala Ala Glu Gly Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Lys Asn
 176 181 186

 Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Asp
 191 196 201

 Ser Phe Gly Asp Ala Ile Arg Thr Ala Gly Pro Leu Leu Gly His Phe
 206 211 216

His Thr Gly Glu Ser Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro
 221 226 231

Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala
 236 241 246 251

Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp
 256 261 266

Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met
 271 276 281

Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Tyr Leu Gly
 286 291 296

Gly

Figura 5