

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 287**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/90** (2006.01)

**C12N 15/61** (2006.01)

**C12N 15/77** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2014 PCT/KR2014/003545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14175655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2014 E 14788838 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2990483**

54 Título: **Mutante de psicosa epimerasa y método para preparar psicosa mediante su uso**

30 Prioridad:

**23.04.2013 KR 20130044700**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHO, YOUNG MOON;  
KIM, CHANG GYEOM y  
LEE, BAEK SEOK**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 656 287 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

Mutante de psicosa epimerasa y método para preparar psicosa mediante su uso

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un mutante de D-psicosa 3-epimerasa, a un vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante y a un microorganismo que incluye el mutante. Asimismo, la presente invención se refiere a un método para preparar D-psicosa utilizando el mutante de enzima o el microorganismo.

10

### **Antecedentes en la técnica**

D-psicosa es un monosacárido conocido por ser un azúcar raro ya que raramente se encuentra en los materiales naturales o está presente en cantidades reducidas. D-psicosa tiene muy pocas calorías y un sabor dulce similar al del azúcar y, por tanto, su uso está muy extendido como edulcorante funcional.

15

D-psicosa es un epímero de D-fructosa y tiene un grado de dulzor y un gusto muy similar al de D-fructosa. A diferencia de D-fructosa, D-psicosa apenas se metaboliza en el organismo y tiene casi cero calorías. D-psicosa se puede utilizar como un ingrediente eficaz para alimentos de dieta ya que D-psicosa tiene la capacidad de inhibir la actividad de una enzima relacionada con la síntesis de lípidos y de reducir la obesidad abdominal. Asimismo, los alcoholes de azúcar, como xilitol y similares, cuyo uso está muy extendido como sustitutos del azúcar, pueden presentar efectos secundarios, como pueda ser causar diarrea, cuando se consumen en grandes cantidades. Por el contrario, se sabe que D-psicosa no tiene sustancialmente ningún efecto secundario.

20

Por esta razón, D-psicosa es objeto de atención como edulcorante de dieta y existe una creciente necesidad de contar con un método para producir eficientemente D-psicosa en la industria de la alimentación. Siendo así, dada la creciente necesidad de desarrollar D-psicosa, ha habido varias tentativas para producir D-psicosa a partir de D-fructosa utilizando los métodos biológicos existentes. Como enzimas capaces de convertir D-fructosa en D-psicosa, se conocen D-psicosa 3-epimerasa (DPE) derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y D-tagatosa 3-epimerasa derivada de *Pseudomonas cichorii* o *Rhodobacter sphaeroides*. Se sabe que D-psicosa 3-epimerasa tiene una actividad mayor que D-tagatosa 3-epimerasa.

25

30

En la producción D-psicosa, se produce más D-psicosa al aumentar la temperatura de reacción. Sin embargo, cuando se utiliza un tipo silvestre de D-psicosa 3-epimerasa para la producción de D-psicosa, se desnaturaliza la enzima a una temperatura de reacción de aproximadamente 50 °C o más, lo que reduce la actividad de la enzima, causando así el problema de que se reduce la cantidad de D-psicosa producida. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de contar con un mutante de D-psicosa 3-epimerasa con una mejor resistencia térmica para producir eficientemente D-psicosa con una alta utilidad.

35

### 40 **Divulgación**

#### **Problema técnico**

Los autores de la presente invención se han dado cuenta del hecho de que D-psicosa 3-epimerasa de *Agrobacterium tumefaciens* presentado en la SEQ ID NO: 1 apenas se ha utilizado por su baja estabilidad térmica a pesar de su alta actividad. Por lo tanto, los autores de la presente invención han desarrollado un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una mejor estabilidad térmica y un método para producir de forma continua D-psicosa empleando dicho mutante de manera que es posible producir a nivel industrial a gran escala D-psicosa que es objeto de atención como un importante aditivo de los alimentos.

50

Concretamente, la presente invención se dirige a proporcionar un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una mejor estabilidad térmica sustituyendo un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre.

Por otra parte, la presente invención tiene por objeto proporcionar un polinucleótido que codifica un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una mejor estabilidad térmica.

55

Asimismo, la presente invención está dirigida a proporcionar un vector recombinante que incluye un gen que codifica un mutante de D-psicosa 3-epimerasa.

60

Asimismo, la presente invención está dirigida a proporcionar un microorganismo recombinante transformado para producir un mutante de D-psicosa 3-epimerasa.

Asimismo, la presente invención está dirigida a proporcionar un método para preparar D-psicosa a partir de D-fructosa utilizando el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo recombinante transformado para producir un mutante de D-psicosa 3-epimerasa.

65

**Solución técnica**

La presente invención proporciona un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una mejor estabilidad térmica para producir eficientemente D-psicosa sustituyendo un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácidos de D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre.

Concretamente, la presente invención proporciona un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que incluye una secuencia de aminoácidos en la que el ácido glutámico en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre derivada de *Agrobacterium tumefaciens* está sustituido con prolina, en la que D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre se muestra en la SEQ NO: 1. El mutante puede incluir una secuencia de aminoácidos en la que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, cisteína y valina, y/o serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con cisteína.

El mutante puede incluir una secuencia de aminoácidos en la que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con leucina, y serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con cisteína.

La presente invención se refiere también a un polinucleótido que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere también a un vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa.

La presente invención se refiere también a un método para producir D-psicosa, que incluye: proporcionar D-fructosa con un mutante de D-psicosa 3-epimerasa de la presente invención o un microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa, causando así la reacción de enzima; y purificar la masa de reacción de enzima resultante para obtener D-psicosa.

La presente invención se refiere también a un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que incluye una columna rellena con un vehículo en la que se inmoviliza el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere además a un método para producir D-psicosa suministrando una solución de D-fructosa al reactor inmovilizado.

**Efectos ventajosos**

La presente invención proporciona un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una notable mejor estabilidad térmica al mismo tiempo que mantiene su actividad de enzima, en el que un aminoácido en una posición específica de una secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre mostrada en la SEQ ID NO: 1 está sustituido, en virtud de lo cual se da cabida a que D-psicosa, que es objeto de atención actualmente como material alimentario, se produzca más eficientemente y a nivel industrial a gran escala.

Concretamente, el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con una realización de la presente invención tiene una semivida notablemente prolongada a la temperatura de reacción de la enzima en comparación D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre o los mutantes previamente conocidos de la misma, en virtud de lo cual se da cabida a que la D-psicosa 3-epimerasa preparada se utilice durante un largo período de tiempo en la producción de D-psicosa. Por lo tanto, el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la presente invención puede reducir el tiempo y el coste de producción mejorando así la eficiencia de producción.

Asimismo, de acuerdo con otra realización de la presente invención, se puede producir eficientemente D-psicosa a gran escala utilizando el vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa.

**Descripción de los dibujos**

Fig. 1 representa un modelado molecular de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens*.

Fig. 2 es un gráfico que representa la estabilidad térmica del mutante de D-psicosa 3-epimerasas del Ejemplo 1 en comparación con la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre del Ejemplo Comparativo 1.

Fig. 3 es un gráfico que representa la estabilidad térmica de mutante de D-psicosa 3-epimerasa (133L/E77P/S213C) del Ejemplo 2 en comparación con el mutante de D-psicosa 3-epimerasa (133L/S213C) convencional del Ejemplo Comparativo 2.

## 5 Mejor modo

A continuación, se describirá la presente invención con mayor detalle. Las descripciones de los detalles que sean evidentes para las personas especializadas en la técnica con un conocimiento normal dentro de este campo técnico o el campo correspondiente se omiten en el presente documento.

La presente invención se refiere a un mutante de D-psicosa 3-epimerasa (en adelante denominado "Mutante E77P") que incluye una secuencia de aminoácidos en la que el ácido glutámico en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos de una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* está sustituido con prolina. La secuencia de aminoácidos del mutante de enzima está representado por SEQ ID NO: 2.

*Agrobacterium tumefaciens* es una cepa conocida y, en más detalle, se puede utilizar *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 33970.

La conformación de D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* fue descubierta en 2006, y actualmente, la información conformacional de la misma se divulga en el Banco de Datos de proteínas (en adelante denominado "BDP"). D-psicosa 3-epimerasa (BDP ID: 2HK1) comprende 309 aminoácidos y se la conoce por formar un complejo, es decir un tetrámero que comprende cuatro monómeros. La D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre tiene una estructura en la que están conectadas de forma repetida hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$  para formar un sitio activo en el que se puede unir D-fructosa como sustrato.

La D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o fragmentos funcionales de la misma. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmentos funcionales" puede referirse a fragmentos que incluyen mutaciones como consecuencia de una sustitución, una inserción o una delección de algunos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad de conversión de D-fructosa en D-psicosa.

El Mutante E77P puede incluir una secuencia de aminoácidos en la que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, cisteína y valina, y/o serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con cisteína.

Concretamente, el Mutante E77P incluye una secuencia de aminoácidos en la que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con leucina y serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre está sustituida además con cisteína. Este mutante se puede denominar "mutante I33L/E77P/S213C". El aminoácido del mutante I33L/E77P/S213C está representado por SEQ ID NO: 3.

Como tal, la presente invención proporciona un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tiene una mejor estabilidad térmica, en comparación con la epimerasa de tipo silvestre o un mutante de epimerasa convencional, sustituyendo aminoácidos en posiciones específicas, en concreto un aminoácido en la posición 77, adicionalmente un aminoácido en la posición 33 y/o un aminoácido en la posición 213 en la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre, en virtud de lo cual se da cabida a una producción eficiente de D-psicosa utilizando el mutante.

La presente invención se refiere también a un polinucleótido que codifica el mutante E77P. El polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica un mutante en el que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos está sustituida además con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, cisteína y valina, y/o serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos está sustituida además con cisteína además de la sustitución de ácido glutámico en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos con prolina. Más concretamente, el polinucleótido es un polinucleótido que codifica el mutante I33L/E77P/S213C.

La presente invención se refiere también a un vector recombinante que incluye un gen que codifica un mutante de D-psicosa 3-epimerasa divulgado en la presente invención. Los vectores utilizados para construir el vector recombinante no están limitados en particular y se puede utilizar cualquier vector empleado normalmente en la técnica. Entre los ejemplos de vectores se incluye concretamente un vector plásmido. Concretamente, el plásmido puede ser un plásmido pUC, sin limitarse sólo a él. Asimismo, tal como se expone más adelante, es posible utilizar un vector lanzadera derivado de microorganismos que pertenecen a *Escherichia coli*, *Escherichia coli* recombinante, *Bacillus*, levadura, *Corynebacterium* o *Agrobacterium* para transformar los microorganismos mencionados. Concretamente, se pueden utilizar vectores lanzadera derivados de microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium* o al género *Agrobacterium*.

La presente invención se refiere también a un microorganismo recombinante transformado para producir un mutante de D-psicosa 3-epimerasa. El microorganismo recombinante puede incluir, por ejemplo, microorganismos transformados con el vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de la presente invención. Entre los ejemplos de microorganismos se pueden incluir *Escherichia coli*, *Escherichia coli* recombinante, *Bacillus*, levadura, *Corynebacterium* o *Agrobacterium*. En particular, se puede utilizar en la presente invención *Corynebacterium glutamicum*.

Concretamente, las cepas del género *Corynebacterium* son generalmente reconocidos como cepas GRAS (por sus siglas en inglés – generalmente reconocidos como seguros) y tienen las propiedades de su facilidad de utilización en ingeniería genética y su cultivo a gran escala. Asimismo, las cepas del género *Corynebacterium* tienen una alta estabilidad en varias condiciones de proceso y una estructura de membrana celular relativamente fuerte en comparación con otras bacterias. Por estas razones, las cepas tienen propiedades biológicas que permiten que existan células bacterianas en un estado estable a una alta presión osmótica gracias a la alta concentración de azúcar y similares.

La presente invención se refiere también a *Corynebacterium glutamicum* CJ KY (KCCM11403P) transformada con el vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de la presente invención. La cepa recombinante, *Corynebacterium glutamicum* CJ KY (KCCM11403P) fue depositada en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) (Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), que es un depósito internacional, el 28 de marzo de 2013, con el número de referencia KCCM 11403P en conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest.

La presente invención se refiere también a un método para preparar D-psicosa a partir de D-fructosa utilizando el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo de la presente invención. El método puede incluir: proporcionar a D-fructosa el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de la presente invención, en virtud de lo cual se causa una reacción de enzima; y recuperar D-psicosa tras la purificación del producto de reacción de enzima.

En el método para preparar D-psicosa, las condiciones de reacción como la concentración, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, el pH, la concentración de D-fructosa del mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo se pueden ajustar convenientemente dependiendo del fin deseado.

Por ejemplo, la temperatura para la reacción de enzima puede estar comprendida entre 20 °C y 60 °C y el tiempo de reacción puede oscilar entre 1 minuto y 2 horas. La relación entre el peso del mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo y D-fructosa puede estar comprendida entre aproximadamente 1:10 y 10:1. Concretamente, la temperatura de reacción oscila entre 30 °C y 55°C, el tiempo de reacción oscila entre 10 minutos y 90 minutos y la relación de peso puede estar comprendida entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 5:1.

Se puede añadir además un ion metálico a la reacción de enzima.

Concretamente, la reacción de enzima se puede llevar a cabo en presencia de metales. D-psicosa 3-epimerasa es una metaloenzima, cuya activación está regulada por iones metálicos y, por tanto, tiene la ventaja de que se aumenta la actividad de enzima en presencia de iones metálicos.

El tipo de metal que se utilice puede incluir manganeso, níquel, cobre y similares. Concretamente, es posible utilizar manganeso. La concentración de metal puede ser concretamente de 0,01 mM a 5 mM, más concretamente de 0,1 mM a 5 mM, más concretamente aún de 0,5 mM a 3 mM. Dentro de este intervalo, la presente invención tiene la ventaja de que se puede regular apropiadamente la actividad del mutante de D-psicosa 3-epimerasa aumentando así la eficiencia de producción de D-psicosa.

En la producción de D-psicosa, la reacción para aumentar la eficiencia de producción de D-psicosa puede llevarse a cabo concretamente a un pH de aproximadamente 5 a 9.

Asimismo, la presente invención se refiere a un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que incluye una columna rellena con un vehículo en el que se inmoviliza el mutante de D-psicosa 3-epimerasa o el microorganismo recombinante transformado para producir el mutante. La presente invención se refiere a un método para producir D-psicosa introduciendo en el reactor inmovilizado una solución de D-fructosa.

El término "reactor inmovilizado" se refiere a un reactor en el que se realiza la reacción para producir D-psicosa con una cepa inmovilizada en un vehículo o con una enzima, o a través de una cepa inmovilizada sobre un vehículo o a través de una columna cargada con una enzima. Es decir, la inmovilización significa que se inmoviliza en un vehículo una sustancia que proporciona actividad biológica, en este caso D-psicosa 3-epimerasa o una cepa que la incluye.

El vehículo para inmovilizar el mutante de enzima o el microorganismo recombinante no está limitado en particular y se puede utilizar cualquier vehículo aplicable para la inmovilización de enzimas o microorganismos en este campo

técnica o los campos pertinentes. Concretamente, se utiliza alginato sódico.

Alginato sódico es un polisacárido coloidal natural abundante en las membranas celulares de las algas y consiste en ácido manurónico y ácido glurónico, que están unidos a través de una unión beta-1,4- aleatoriamente en número de ácido manurónico y glurónico. El alginato sódico puede utilizarse para la inmovilización estable de cepas o enzimas.

A continuación, se describirá la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales. Debe entenderse que estos ejemplos y ejemplos experimentales tienen un fin ilustrativo únicamente y no se han de interpretar en absoluto como exhaustivos del alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Preparación de Mutante E77P de D-psicosa 3-epimerasa

(1) Selección de sitio de secuencia de aminoácidos que se va a sustituir

Después de analizar la estructura de D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre (Fig. 1) utilizando un programa de análisis de estructura de proteínas de uso general, PyMol, se seleccionó un aminoácido en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre como el aminoácido para la sustitución responsable de mejorar la resistencia al calor de la enzima sin afectar a la actividad de la enzima.

En la Fig. 1, se indica la posición del ácido glutámico en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos.

(2) Preparación de Mutante E77P

Se sustituyó ácido glutámico (Glu, E) en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC33970 con prolina por mutagénesis dirigida a sitio. Para sobre-expresar el mutante de D-psicosa 3-epimerasa sustituido, se insertó un gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa en un vector pUC\_HCE para construir un vector recombinante, que se insertó después en *E. coli* K12G utilizando un método de choque térmico.

Se inoculó en medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina *E. coli* K12G transformado seguido del cultivo a 37 °C durante 6 horas. Se tomó una porción de la solución de cultivo, se transfirió a un medio que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 0,1 mM de IPTG (Isopropil-β-tiogalactopiranosida) y a continuación se cultivó a 37 °C durante 6 horas para inducir la expresión del mutante de D-psicosa 3-epimerasa. A continuación, se trató térmicamente la solución cultivada a 60 °C durante 5 minutos, seguido de la adición de D-fructosa con la concentración final de 15 mM, en virtud de lo cual se causó la reacción a 55 °C durante 30 minutos. Utilizando un equipo de ensayo de fructosa convencional, se midió la cantidad residual de D-fructosa. Como resultado de la medición, se confirmó que el mutante de D-psicosa 3-epimerasa E77P de la presente invención presentó una alta semivida a la temperatura de reacción de 55 °C.

El término "semivida", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al período que transcurre hasta que se reduce a 50 la actividad relativa de la reacción inicial de enzima de una enzima o una enzima mutante, cuando la actividad relativa de la reacción inicial de la enzima de la enzima o el mutante de enzima se presupone en 100.

### Ejemplo 2

#### Preparación de mutante compuesto I33L/E77P/S213C de D-psicosa 3-epimerasa

Para sobre-expresar la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC33970, se insertó un gen que codifica la enzima en un vector pUC\_HCE para construir un vector recombinante. Se preparó mutante I33L/E77P/S213C por mutagénesis dirigida a sitio. Se transformó *E. coli* K12G con el vector recombinante seguido del cultivo de las cepas para dar cabida a la sobre-expresión del mutante de enzima.

### Ejemplo 3

#### Construcción de un vector recombinante que incluye un gen que codifica el mutante compuesto I33L/E77P/S213C de D-psicosa 3-epimerasa y transformación de una cepa que pertenece al género *Corynebacterium* utilizándolo

(1) Construcción de un vector recombinante y transformación de cepas utilizándolo

Se amplificó el gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se utilizó el ADN del mutante I33L/E77P/S213C de acuerdo con Ejemplo 2 como matriz y se utilizó un oligonucleótido que incluía las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción PstI y XbaI como cebador. Para expresar el mutante de D-psicosa 3-epimerasa codificado por el gen amplificado a gran escala, se construyó un vector de expresión recombinante por digestión de un vector lanzadera pCJ-1 (depositado en el Centro Coreano de

Cultivo de Microorganismos (KCCM), que es un depósito internacional, el 6 de noviembre de 2004 con el número de referencia KCCM-10611) derivado de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* con las enzimas de restricción KpnI y Xba I; y ligado de un promotor lysC (NCg10247) derivado de *Corynebacterium glutamicum* y el producto de PCR amplificado con el vector lanzadera pCJ-1 digerido. Se introdujo el vector de expresión recombinante en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 por transformación utilizando electroporación para preparar una cepa recombinante capaz de expresar un gen que codifica un mutante de D-psicosa 3-epimerasa (I33L/E77P/S213C). Se depositó la cepa recombinante *Corynebacterium glutamicum* CJ KY En el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM), que es un depósito internacional, el 28 de marzo de 2013 con el número de referencia KCCM 11403P en conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest.

## (2) Cultivo de la cepa recombinante

Se inoculó en medio MB que contenía 10 µg/ml de kanamicina (10 g/l de Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura Bacto, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de peptona de soja) la cepa recombinante obtenida en el punto (1) anterior a una concentración inicial de OD<sub>600</sub>=0,1, seguido del cultivo a 30 °C durante 24 horas para inducir la expresión de mutantes de D-psicosa 3-epimerasa. Se añadió la solución de cultivo obtenida a un fermentador cargado con un medio modificado (8 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona de soja, 10 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 g/l de MgSO<sub>4</sub>) que contiene 10 µg/ml de kanamicina a OD<sub>600</sub>=0,6 y se cultivó a 30 °C durante 20 horas.

## Ejemplo Comparativo 1

Del mismo modo que en el Ejemplo 1, se prepararon un vector y una cepa que pertenece al género *Corynebacterium* transformada con el vector con la excepción de que se utilizó un gen que codifica una D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* en lugar del mutante E77P del Ejemplo 1.

## Ejemplo Comparativo 2

Del mismo modo que en el Ejemplo 1, se prepararon el mutante I33L/S213C del Ejemplo Comparativo 2, un vector que incluyó el gen mutante y una cepa recombinante que pertenecía al género *Corynebacterium* transformada con el vector con la excepción de que se utilizó un gen que codifica un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que tenía una secuencia de aminoácidos en la que isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC33970 había sido sustituida con leucina y cisteína en la posición 213 con prolina por mutagénesis dirigida a sitio del Ejemplo 1.

## Ejemplo Experimental 1

### Evaluación de la resistencia térmica y la actividad de enzima del mutante de D-psicosa 3-epimerasa

#### (1) Tratamiento térmico

Se introdujo cada una de las cepas K12G *E. coli* recombinantes preparadas en Ejemplo 1 al Ejemplo 3, el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2 en un matraz de 250 ml cargado con 50 ml de medio LB, seguido del cultivo en una incubadora en agitación a 37 °C durante aproximadamente 12 horas. Se centrifugó la solución de cultivo de K12G *E. coli* resultante a 7.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, seguido de la suspensión en 5 ml de 50 mM solución de tampón EPPS, pH 8,0. A continuación, se lisó la suspensión resultante utilizando un ultrasonificador colocado sobre hielo durante 10 minutos, seguido de centrifugación a 13,000 x g durante 40 minutos a 4 °C, proporcionando así un sobrenadante que se almacenó una vez separado.

Se midió la concentración de proteínas del sobrenadante a través de un ensayo de proteínas Bradford y a continuación, se ajustó la concentración total de proteína a 0,1 mg/ml utilizando 50 mM solución de tampón EPPS, pH 8,0. Tras la sobreexpresión se identificó el mutante de D-psicosa 3-epimerasa por SDS-PAGE, se trató térmicamente el mutante en un baño de agua en agitación a 50 °C y 55 °C durante 1 hora, 2 horas y 4 horas, cada uno de ellos, respectivamente.

#### (2) Medición de la actividad de enzima a través de la producción de D-psicosa utilizando D-fructosa como sustrato

Después del tratamiento térmico, para medir la actividad de enzima del mutante de enzima, se mezcló cada una de las soluciones de proteína tratadas térmicamente con 50 mM solución de tampón EPPS, pH 8,0 que contenía 40 mM de D-fructosa en una relación de 1:1, seguido de la reacción a 50 °C durante 10 minutos. A continuación, se detuvo la reacción por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Se diluyó la solución de reacción a 1/40 y se midió la cantidad de D-psicosa generada a partir de D-fructosa por HPLC.

Como resultado, se observó que el mutante E77P (Ejemplo 1) había mejorado su resistencia térmica en 4 °C o más en comparación con la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre (Ejemplo Comparativo 1) (véase Fig. 2).

Asimismo, se observó que el mutante I33L/E77P/S213C (Ejemplo 2) había mejorado su resistencia térmica en 5 °C o más en comparación con el mutante I33L/S213C (Ejemplo Comparativo 2). Se identificó que la semivida del mutante I33L/E77P/S213C a 55°C fue mayor que la semivida del mutante I33L/S213C a 50 °C (véase Fig. 3).

5 En las Fig. 2 y 3, respectivamente, se muestran los resultados de las mediciones de la actividad de enzima. Concretamente, en la Fig. 2, se muestra un gráfico en el que se representa la actividad de enzima residual relativa de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre del Ejemplo Comparativo 1 y el mutante E77P del Ejemplo 1 después de la reacción de la enzima de tipo silvestre y el mutante de enzima a las dos temperaturas (50 °C y 55 °C) durante 1 hora, 2 horas y 4 horas, respectivamente. Por otra parte, Fig. 3 es un gráfico en el que se representa la actividad de enzima residual relativa del mutante I33L/S213C del Ejemplo Comparativo 2 y el mutante I33L/E77P/S213C del Ejemplo 2 tras la reacción de estos dos mutantes a las dos temperaturas (50 °C y 55 °C) durante 1 hora, 2 horas y 4 horas, respectivamente.

15 Tal como se puede observar en las Fig. 2 y 3, el mutante de enzima de acuerdo con la presente invención presenta una mejor estabilidad térmica en comparación con la cepa de tipo silvestre anterior o un mutante anteriormente conocido, I33L/S213C.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION
- <120> Variantes de D-psicosa 3-epimerasa y método de producción de D-psicosa con su uso
- <130> P14-5030
- 25 <150> KR 2013/0044700
- <151> 23-04-2013
- <160> 3
- 30 <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 289
- 35 <212> PRT
- <213> Psicosa epimerasa de tipo silvestre derivada de Agrobacterium tumefaciens
- <400> 1

ES 2 656 287 T3

```

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
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 Tyr 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 Val 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 Val Leu Gly
           275           280           285
Gly

```

<210> 2  
 <211> 289  
 <212> PRT

ES 2 656 287 T3

<213> Variantes E77P de psicosa epimerasa

<400> 2

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 Pro Asp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 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 Tyr 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 Val 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 Val Leu Gly  
 275 280 285  
 Gly

5

<210> 3

<211> 289  
<212> PRT  
<213> Variantes I33LE77PS213C de psicosa epimerasa

5 <400> 3

ES 2 656 287 T3

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

Leu 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 Pro Asp Ala Ala  
 65 70 75 80

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 Tyr 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 Val 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 Cys 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

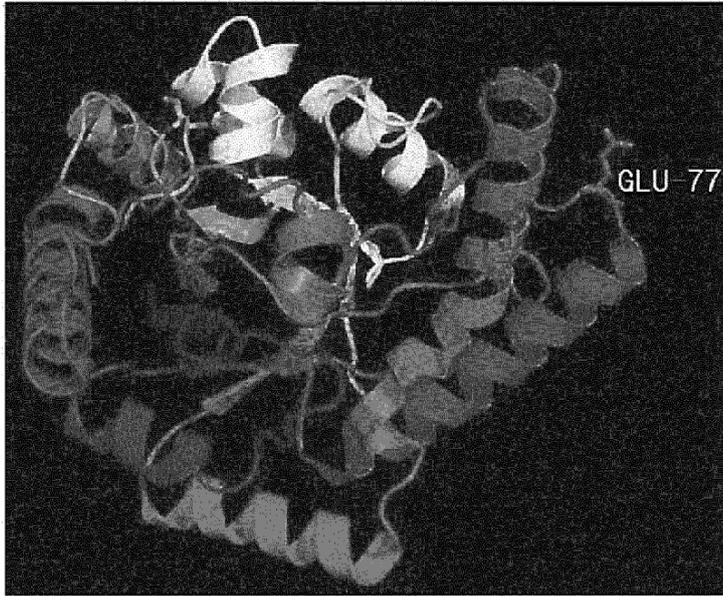
Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Val Leu Gly  
 275 280 285

Gly

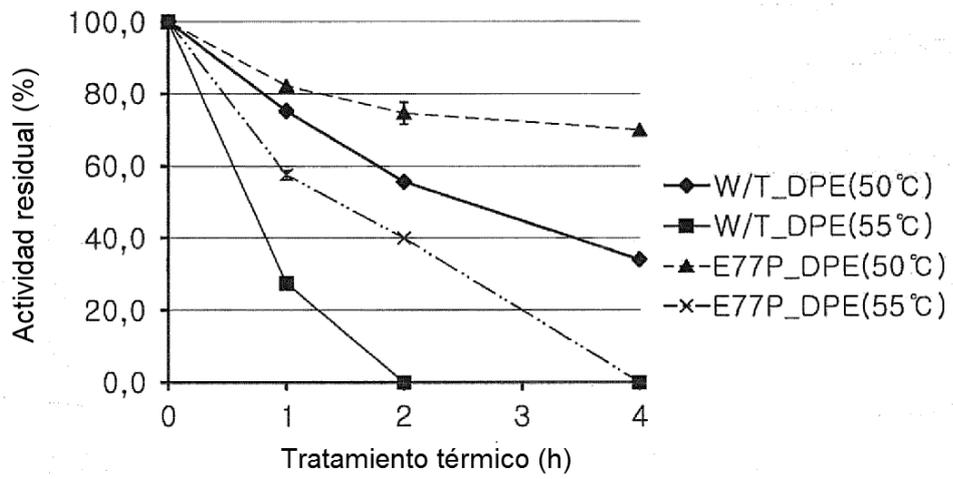
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mutante de D-psicosa 3-epimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el ácido glutámico en la posición 77 de la secuencia de aminoácidos de la D-psicosa 3-epimerasa de tipo silvestre de *Agrobacterium tumefaciens* representada por SEQ ID NO: 1 o fragmentos funcionales de la misma está sustituido con prolina.
- 10 2. El mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la reivindicación 1, donde isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, cisteína y valina, o serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con cisteína.
- 15 3. El mutante de D-psicosa 3-epimerasa de acuerdo con la reivindicación 1, donde isoleucina en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con leucina y serina en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos está sustituida con cisteína.
- 20 4. Un polinucleótido que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Un vector recombinante que comprende el gen que codifica el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 6. Un microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 7. El microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, donde el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
- 40 8. Un método para producir D-psicosa, que comprende:  
30 proporcionar a D-fructosa el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el microorganismo recombinante transformado para producir el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de la reivindicación 6 o 7, causando así una reacción de enzima; y recuperar D-psicosa tras la purificación del producto de la reacción de enzima.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde se añade además un ion metálico a la reacción de enzima.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el metal es manganeso.
- 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el ion metálico se añade en una concentración de 0,01 mM a 5 mM.
- 45 12. Un reactor inmovilizado para producir D-psicosa que comprende una columna rellena con un vehículo en el que se inmoviliza el mutante de D-psicosa 3-epimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el microorganismo recombinante de la reivindicación 6.
- 45 13. Un método para producir D-psicosa, suministrando una solución de D-fructosa al reactor inmovilizado de la reivindicación 12.

[Fig.1]



[Fig.2]



[Fig. 3]

