

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 022**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/24	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12N 9/90	(2006.01)
C12N 15/61	(2006.01)
C12N 15/77	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/KR2014/003658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15133678**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14884327 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 3115453**

54 Título: **Variante de L-arabinosa isomerasa para producir D-tagatosa**

30 Prioridad:
05.03.2014 WO PCT/KR2014/001789

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2018

73 Titular/es:
**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center 330, Dongho-ro Jung-gu
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:
**OH, IN SEOK;
KIM, CHANG GYEOM;
CHO, SEUNG HYUN;
KIM, SEONG BO;
KIM, YANG HEE;
CHO, KYONG YEON;
YANG, SUNG JAE y
KIM, JIN HA**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 678 022 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

Variante de L-arabinosa isomerasa para producir D-tagatosa

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una variante de la L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DMS 5068, la cual se produce por ingeniería de proteínas y tiene una actividad incrementada de conversión de D-galactosa en D-tagatosa, un microorganismo que expresa la variante de L-arabinosa isomerasa, y un método de producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa usando el microorganismo. La variante se caracteriza por sustituciones en las posiciones 275 y 769 de la isomerasa.

Antecedentes de la técnica

15 La D-tagatosa es un monosacárido que tiene dulzor igual a aproximadamente el 90 % de el del azúcar mientras que tiene propiedades, incluyendo bajas calorías y propiedades de no caries. Se puede usar como un edulcorante sano sin causar diversas enfermedades adultas, a diferencia de los edulcorantes convencionales.

20 Debido a tales propiedades, la D-tagatosa se recibe como un sustituto del azúcar y se sabe que tiene alto potencial comercial en el mercado de alimentos. Sin embargo, la tagatosa es un azúcar raro que no está abundantemente presente en la naturaleza, pero está contenido en productos lácteos o algunas plantas en cantidades muy pequeñas. Por esta razón, para que la tagatosa se use como un edulcorante funcional de bajas calorías, se debería desarrollar la tecnología capaz de producir tagatosa.

25 La D-tagatosa se produjo mediante un proceso de isomerización química a partir de la D-galactosa usando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como catalizador por Arla Foods Ingredients Inc. en 2003, y se ha comercializado bajo el nombre comercial "Gaio-tagatosa". Sin embargo, se sabe que el proceso de isomerización química es excelente en términos de rendimiento de la conversión por isomerización, pero tiene defectos en el sentido de que la recuperación y la purificación son difíciles y el proceso es complejo y, por tanto, el rendimiento total del proceso es menor que el de un proceso de isomerización enzimático.

30 La L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.5) es una enzima que cataliza una reacción de isomerización de conversión de L-arabinosa en L-ribulosa. Además, se sabe que la L-arabinosa isomerasa convierte no solamente L-arabinosa (es decir su sustrato natural) en L-ribulosa, sino también D-galactosa (es decir un sustrato estructuralmente similar a L-arabinosa) en D-tagatosa.

35 El factor más importante capaz de contribuir a un incremento en la productividad de un proceso de producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa usando la L-arabinosa isomerasa es desarrollar una enzima, la cual tenga buena reactividad y se pueda aplicar con éxito al proceso de producción, a través de la modificación de la isomerasa. Debido a que un incremento en la productividad juega un papel crucial en la maximización del beneficio por un descenso en el coste de producción y el éxito del negocio, ha habido una necesidad continua de modificar la arabinosa isomerasa.

40 La arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 que es un microorganismo termófilo tiene un estabilidad térmica muy alta, pero necesita mejorar más para asegurar la productividad económica de la arabinosa isomerasa, la cual es comparable a la de la glucosa isomerasa.

45 El documento WO 2014/137148 (septiembre de 2014) describe una variante de L-arabinosa isomerasa derivada a partir de *Thermotoga neapolitana* y un método para producir D-tagatosa a partir de D-galactosa usando la enzima o un microorganismo de *Corynebacterium* que expresa la misma.

50 Generalmente, los métodos de producción de enzimas variantes para incrementar las actividades de las enzimas o para producir enzimas activas para nuevos sustratos se dividen en gran parte en un método de mutagénesis al azar y un método de diseño racional. El método de mutagénesis al azar es muy usado, debido a se pueden usar sin requerir especial información sobre una enzima diana. Sin embargo, se requiere un sistema de cribado capaz de procesar un gran número de enzimas variantes. Por otro lado, la modificación de enzimas por diseño racional no requiere de sistema de cribado especial, debido a que produce solamente un número limitado de enzimas variantes. Sin embargo, en el caso del diseño racional, los factores que determinan el mecanismo catalítico, propiedad de unión a sustrato o especificidad de sustrato de una enzima diana se deberían investigar en detalle.

60 Divulgación

Problema técnico

65 Por consiguiente, el solicitante ha intentado incrementar la especificidad de sustrato de la L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 para D-galactosa cambiando la estructura tridimensional de la L-arabinosa

isomerasa basándose en la ingeniería de proteínas, modelado molecular y análisis del mecanismo de reacción enzimática de manera que la arabinosa isomerasa que tiene potencial para producir tagatosa pueda tener la capacidad de producir industrialmente tagatosa.

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una variante de la arabinosa isomerasa a partir de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, la cual tiene actividad de conversión incrementada, y una secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un vector recombinante que comprenda la secuencia de nucleótidos génica, y un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector recombinante.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método de producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa usando o bien la variante de arabinosa isomerasa o el microorganismo transformado o un cultivo del microorganismo transformado.

15 Solución técnica

La presente invención proporciona variantes de arabinosa isomerasa, polinucleótidos, vectores, microorganismos y métodos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

20 Para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una variante de arabinosa isomerasa que tiene una actividad incrementada de conversión de D-galactosa en D-tagatosa, teniendo la variante de arabinosa isomerasa una sustitución de prolina para leucina en la posición 469 y una sustitución de un aminoácido distinto de la fenilalanina para un aminoácido en la posición 275 de la arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, y una secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante de arabinosa isomerasa.

25 La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos génica, y un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector recombinante.

30 La presente invención también proporciona un método de producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa usando la variante de arabinosa isomerasa.

La presente invención también proporciona un método para producir D-tagatosa, comprendiendo el método cultivar el microorganismo transformado de la invención.

35 Efectos ventajosos

Según la presente invención, la producción de la D-tagatosa se puede incrementar usando un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con la nueva variante de arabinosa isomerasa o la secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante de arabinosa isomerasa, reduciendo de ese modo el coste de producción y la inversión en infraestructura.

Descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra una estructura compuesta del sitio activo e ion de manganeso cofactor de la L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*.

La Figura 2 muestra los sitios de la L-arabinosa y la D-galactosa, los cuales se unen al sitio activo de la L-arabinosa isomerasa, y los grupos funcionales de la L-arabinosa y la D-galactosa, los cuales interactúan con el sitio activo de la L-arabinosa isomerasa. Se muestra que el carbono 6 de la D-galactosa causa impedimento estérico con el resto de fenilalanina en la posición 275 de la L-arabinosa isomerasa.

50 La Figura 3 muestra los resultados obtenidos sustituyendo el resto en 275 de la L-arabinosa isomerasa a mutagénesis saturada y comparando la actividad relativa de las variantes, seleccionadas por el método de cisteína-carbazol, a través de una reacción de desarrollo de color. Se encontró un número considerable de variantes que mostraban una actividad mayor que la de un control.

55 La Figura 4 muestra las estructuras de variantes seleccionadas (F275V/L469P, F275M/L469P, y F275I/L469P), previstas por una técnica de modelado molecular.

La Figura 5 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de variantes aisladas y purificadas de L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*.

60 La Figura 6 muestra los resultados de evaluación de la actividad relativa de variantes seleccionadas a temperaturas variantes para determinar las temperaturas óptimas de las variantes.

La Figura 7 muestra los resultados de la medición de las estabildades térmicas de variantes seleccionadas a 95 °C en función del tiempo.

La Figura 8 muestra los resultados de evaluación de la actividad relativa de variantes seleccionadas para determinar la dependencia de las variantes sobre manganeso.

65

Modo para la invención

Se describe una variante de la arabinosa isomerasa a partir de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, la cual tiene actividad de conversión incrementada, y una secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante.

La presente invención proporciona una variante de arabinosa isomerasa que tiene una actividad incrementada de conversión de D-galactosa en D-tagatosa, teniendo la variante de arabinosa isomerasa una sustitución de prolina para leucina en la posición 469 y una sustitución de un aminoácido distinto de fenilalanina para un aminoácido en la posición 275 de la arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, y una secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante de arabinosa isomerasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión “arabinosa isomerasa que convierte D-galactosa en D-tagatosa” significa una enzima que cataliza una reacción de isomerización que usa D-galactosa como sustrato para producir D-tagatosa.

La variante de arabinosa isomerasa según la presente invención preferentemente tiene una sustitución de un aminoácido que tiene una cadena lateral alifática no polar para un aminoácido en la posición 275 de la arabinosa isomerasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión “aminoácido que tiene una cadena lateral alifática no polar” significa alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o prolina.

Preferentemente, el aminoácido en la posición 275 de la arabinosa isomerasa está sustituido con un aminoácido cualquiera seleccionado del grupo que consiste en valina, metionina e isoleucina.

Preferentemente, la variante de arabinosa isomerasa según la presente invención tiene además una sustitución de prolina para leucina en la posición 469 de la arabinosa isomerasa.

Como se usa en el presente documento, el término “sustitución” significa sustitución de un aminoácido en una posición específica con otro aminoácido para producir una mutación. Un método de mutagénesis adecuado puede ser cualquier método que se pueda usar por los expertos en la técnica para este fin. Particularmente, el método de mutagénesis puede ser un método de mutagénesis saturada, un método de mutagénesis al azar o un método de mutagénesis dirigida (“Evolutionary molecular engineering based on RNA replication”, *Pure Appl. Chem.* 1984, 56:967-978; “Promoters selected from random DNA-sequences”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83:7.405-7.409; “Mutants generated by the insertion of random oligonucleotides into the active-site of the beta-lactamase gene”, *Biochemistry* 1989, 28:5.703-5.707).

Preferentemente, la variante de arabinosa isomerasa según la presente invención tiene un aminoácido en la posición 275, sustituido usando el método de mutagénesis saturada, y leucina en la posición 469, sustituida usando el método de mutagénesis dirigida.

En una realización de la presente invención, se realizó mutagénesis al azar usando arabinosa isomerasa tipo silvestre (que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6) de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 como molde, obteniendo de ese modo variantes que tienen características enzimáticas mejoradas e información genética sobre las variantes. Las variantes se analizaron en conjunto, y como resultado, se encontró que la variación en la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la arabinosa isomerasa influía un incremento en la actividad enzimática.

Además, los aminoácidos en la región C-terminal que constituyen el sitio activo de cada una de la arabinosa isomerasa tipo silvestre y la variante de arabinosa isomerasa se analizaron por modelado molecular. Como resultado, se encontró que la variante tenía una sustitución de prolina para leucina en la posición 469 de la arabinosa isomerasa tipo silvestre, y así desaparecía la lámina beta en la posición 18 de la proteína, y el ángulo y la cadena principal se inclinaban cuando la estructura tridimensional de la hélice alfa en la posición 17 se movía hacia el cuerpo proteico, indicando que se cambiaba la estructura de la proteína.

Basándose en los resultados anteriormente descritos, la leucina en la posición 469 de la arabinosa isomerasa tipo silvestre estaba sustituida con prolina usando la mutagénesis dirigida, preparando de ese modo una variante (L469P) (que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7). La variante se incubó y, a continuación, se midió su actividad, y como resultado, se encontró que la variante mostraba una mayor actividad para la galactosa sustrato en comparación con la arabinosa isomerasa tipo silvestre.

En una realización de la presente invención, para obtener una enzima que tenga actividad de conversión incrementada a partir de la variante de arabinosa isomerasa (L469P), se seleccionaron los restos principales de la región de unión a sustrato y la región activa de la enzima, y se estimó el mecanismo de reacción, seleccionando de ese modo el aminoácido en la posición 275. Las mutaciones se introdujeron en la posición 275 usando el método de

mutagénesis saturada, y las variantes se cribaron, seleccionando de ese modo variantes que tenían actividad de conversión incrementada.

Las variantes seleccionadas se secuenciaron, y como resultado, se encontró que las variantes tenían sustituciones de valina (L469P/F275V), metionina (L469P/F275M) e isoleucina (L469P/F275I), respectivamente, para el aminoácido en la posición 275. Cada una de las tres variantes se transformaron dentro de microorganismos del género *Corynebacterium*, y se realizó una reacción de isomerización cultivando los microorganismos. Como resultado, se encontró que todas las tres variantes mostraban actividad incrementada en comparación con la variante L469P que tenía una sustitución de prolina para leucina en la posición 469.

Para examinar las características de las tres variantes, las arabinosa isomerasas expresadas se aislaron de los microorganismos del género *Corynebacterium* cultivados bajo las condiciones anteriormente descritas. Se encontró que las proteínas purificadas mostraban actividad de arabinosa isomerasa para D-galactosa. Además, se encontró por SDS PAGE que las proteínas purificadas tenían pesos moleculares coherentes con el de la arabinosa isomerasa.

Usando las enzimas variantes purificadas, se midieron la temperatura óptima, la estabilidad térmica, el uso de ion metálico y la actividad enzimática de las enzimas variantes. Como resultado, se encontró que las tres variantes mostraban la actividad más alta a 75 °C, pero la estabilidad térmica de algún modo descendió, el uso del ion metálico no difería significativamente, y las actividades específicas de las variantes de arabinosa isomerasa eran aproximadamente 5,5 veces mayores (F275V/L469P), 5 veces mayores (F275M/L469P) y 3,9 veces mayores (F275I/L469P), respectivamente, que las de la variante L469P.

En una realización, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos génica que codifica la variante de arabinosa isomerasa.

La secuencia de nucleótidos génica puede ser una seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Se describen variantes de arabinosa isomerasa que pueden tener secuencias de nucleótidos génicas que codifican proteínas que tienen una homología de al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 %, y particularmente preferentemente al menos 97 %, a secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5, siempre que las actividades de la arabinosa isomerasa de las variantes de arabinosa isomerasa de la presente invención se puedan mantener o aumentar. Lo más preferentemente, las variantes de arabinosa isomerasa según la presente invención tienen secuencias de nucleótidos génicas mostradas en las SEQ ID NO: 8 a 10.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos. La homología se puede determinar usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, BLAST 2.0 que calcula parámetros tales como la puntuación, identidad o similitud.

Se describen variantes que codifican variantes de arabinosa isomerasa que pueden hibridar a polinucleótidos mostrados en las SEQ ID NO: 8 a 10 o sondas de los polinucleótidos bajo condiciones estrictas y que funcionan normalmente.

Como se usa en el presente documento, el término "condiciones estrictas" significa las condiciones que permiten la hibridación específica entre los polinucleótidos. Por ejemplo, la hibridación se realiza en un tampón de hibridación (3,5>SSC, Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, albúmina de suero bovino al 0,02 %, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5 %, EDTA 2 mM) a 65 °C ("Molecular Cloning", A Laboratory Manual, J. Sambrook y col., Editores, 2^a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) o "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel y col., Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). En el presente documento, SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M (pH 7). Después de la hibridación, la membrana que tiene ADN transferido a la misma se lava con 2>SSC a temperatura ambiente y, a continuación, se lava con 0,1 a 0,5>SSC/0,1xSDS a una temperatura de 68 °C.

En una realización, la presente invención proporciona una variante de isomerasa que tiene una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. Específicamente, la variante es una arabinosa isomerasa mutante que tiene una sustitución de un aminoácido cualquiera seleccionado del grupo que consiste en valina, metionina e isoleucina para un aminoácido en la posición 275 y que tiene también una sustitución de prolina para un aminoácido en la posición 469.

Se describe una variante que puede ser un mutante o mutante artificial que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones distintas de las posiciones 275 y 469 de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 5, siempre que la actividad de la arabinosa isomerasa se pueda mantener o aumentar.

Como se usa en el presente documento, el término “varios aminoácidos” significa 2 a 20 aminoácidos, preferentemente 2 a 10 aminoácidos, y más preferentemente 2 a 5 aminoácidos, dependiendo del tipo o posiciones de los restos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína.

5 Además, las sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones descritas de aminoácidos pueden incluir mutantes de origen natural o variantes artificiales, basados en diferencias individuales y/o diferencias de especie del microorganismo que expresa la arabinosa isomerasa.

10 En una realización, la presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido unido de manera operable al mismo.

15 Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una construcción de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de un gen codificador de proteína diana unido de manera operable a una secuencia reguladora adecuada para ser capaz de expresar el gen diana en una célula hospedadora adecuada. La secuencia reguladora incluye un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier operador para regular esta transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión a ribosoma de ARNm, y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma hospedador, o puede integrarse en el propio genoma.

20 El vector que se usa en la presente invención no está específicamente limitado y puede ser cualquier vector conocido en la técnica, siempre que pueda replicarse en un hospedador. Ejemplos de los vectores comúnmente usados puede incluir plásmidos naturales o recombinantes, cósmidos, virus y bacteriófagos.

25 Además, el vector que se usa en la presente invención es un vector capaz de transformar células hospedadoras, para insertar el polinucleótido que codifica la proteína diana en el cromosoma de la célula hospedadora. Ejemplos específicos del vector incluyen, pero no se limitan a, un vector lanzadera pECCG112 que se puede auto replicar en ambas direcciones en *E. coli* y bacterias tipo *Coryne* (Kap-Soo, Noh, *Kor. Jour. Microbiol.* julio de 1991, p 149-154).

30 También, el polinucleótido que codifica la proteína diana endógena en el cromosoma se puede reemplazar con un nuevo polinucleótido por un vector para la inserción en el cromosoma bacteriano. La inserción del polinucleótido en el cromosoma se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, recombinación homóloga.

35 Debido a que el vector de la presente invención se puede insertar en el cromosoma por recombinación homóloga, además puede comprender un marcador de selección para confirmar su inserción en el cromosoma. El marcador de selección se usa para seleccionar una célula transformada con el vector, es decir, confirmar la inserción del polinucleótido diana. El marcador de selección que se usa en la presente invención se puede seleccionar de marcadores que proporcionan fenotipos seleccionables, tales como resistencia a fármaco, auxotrofia, resistencia a agentes citotóxicos, o expresión de proteína de superficie. Solamente las células que expresan el marcador de selección son capaces de sobrevivir o mostrar diferentes fenotipos bajo el ambiente tratado con el agente selectivo, y así se pueden seleccionar las células transformadas.

En una realización, la presente invención también proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector recombinante.

45 Como se usa en el presente documento, el término “transformación” significa introducir un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula hospedadora para ser capaz de expresar una proteína codificada por el polinucleótido en la célula hospedadora. Los polinucleótidos transformados incluyen todos los genes insertados en el cromosoma de la célula hospedadora o localizados fuera del cromosoma, siempre que se puedan expresar en la célula hospedadora. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, los cuales codifican la proteína diana. Siempre que el polinucleótido se pueda introducir en la célula hospedadora y expresar en la misma, el gen se puede introducir de cualquier forma. Por ejemplo, el polinucleótido se puede introducir en la célula hospedadora en forma de un casete de expresión que es una construcción de polinucleótidos que incluye todos los elementos para la expresión del gen. El casete de expresión incluye un promotor que se une de manera operable al gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión capaz de auto replicación. El polinucleótido también se puede introducir en la célula hospedadora por sí mismo, y unir de manera operable a la secuencia necesaria para la expresión en la célula hospedadora.

60 El microorganismo de la presente invención incluye cualquiera de los microorganismos procariotas y microorganismos eucariotas, siempre que se pueda expresar la variante de isomerasa. Por ejemplo, se puede incluir un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el género *Brevibacterium*. Preferentemente, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*. Más preferentemente, es *Corynebacterium glutamicum*.

65

En un ejemplo de la presente invención, *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad de producir L-aminoácido se transformó con un vector que tenía una secuencia de nucleótidos de cada una de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, y las cepas construidas se nombraron *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-TNAI-2, pFIS-1-TNAI-3 y pFIS-1-TNAI-4, respectivamente, y se depositaron en el "Korean Culture Center of Microorganisms" (361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea del Sur), una autoridad de depósito internacional, el 14 de febrero de 2013 bajo los números de acceso KCCM11378P, KCCM11379P y KCCM11380P, respectivamente. La presente descripción también se refiere a un cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con un vector recombinante de la invención.

El cultivo puede ser un cultivo no diluido que comprende las células del microorganismo o puede ser una célula microbiana obtenida eliminando el sobrenadante del cultivo o concentrando el cultivo. Una composición del medio para cultivar el microorganismo puede comprender no solamente componentes convencionales requeridos para el cultivo de los microorganismos del género *Corynebacterium*, sino también componentes que tienen un efecto sinérgico sobre el crecimiento de los microorganismos del género *Corynebacterium*, y se pueden seleccionar fácilmente por expertos en la técnica. Además, el cultivo puede estar en un líquido o estado seco, y los métodos para secar el cultivo incluyen, pero no se limitan a, secado al aire, secado natural, secado por pulverización y liofilización.

El microorganismo del género *Corynebacterium* según la presente invención se puede cultivar por cualquier método convencional. Específicamente, el microorganismo se puede cultivar inoculándolo en un medio que contiene totalmente o parcialmente sacarosa o glucosa como fuente de carbono. El proceso de cultivo se puede realizar en medios y condiciones de cultivo adecuados conocidos en la técnica. Este proceso de cultivo puede ser modificado fácilmente por cualquier experto en la técnica dependiendo del tipo de cepa seleccionada. Ejemplos del proceso de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo discontinuo, cultivo continuo, y cultivo de alimentación discontinua. El medio que se usa en el cultivo del microorganismo de la presente invención debería satisfacer apropiadamente los requerimientos del microorganismo de la presente invención.

Específicamente, el medio que se usa en la presente invención contiene sacarosa o glucosa como fuente principal de carbono. Además, las melazas que contienen una alta concentración de sacarosa también se pueden usar como una fuente de carbono. Además, se pueden usar cantidades adecuadas de diversas fuentes de carbono. Preferentemente, se usa glucosa purificada. Ejemplos de fuentes de nitrógeno que se pueden usar en la presente invención incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, y harina de soja, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Preferentemente, se usa peptona. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinación. El medio puede contener fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico y las correspondientes sales que contienen sodio, como fuentes de fósforo. Además, el medio puede contener una sal de metal tal como sulfato de magnesio o sulfato ferroso. Además, el medio puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estos medios o precursores se pueden añadir al medio de una manera discontinua o continua.

El medio de cultivo generalmente se mantiene a una temperatura que oscila de 27 °C a 37 °C, y preferentemente de 30 °C a 37 °C. El cultivo del microorganismo se puede continuar hasta que se obtenga el nivel deseado de la proteína. Preferentemente el periodo de cultivo es de 10 a 100 horas.

La presente invención proporciona un método para producir D-tagatosa, comprendiendo el método hacer reaccionar una solución que contiene D-galactosa con una fuente de ion metálico seleccionada del grupo que consiste en iones de manganeso, iones de magnesio e iones de zinc en presencia de la variante de arabinosa isomerasa que tiene una actividad de conversión de D-galactosa en D-tagatosa, el microorganismo transformado del género *Corynebacterium*, o un cultivo del microorganismo transformado del género *Corynebacterium*, produciendo de ese modo D-tagatosa.

Para permitir que un sustrato se introduzca en el microorganismo transformado del género *Corynebacterium*, o un cultivo del microorganismo transformado del género *Corynebacterium*, las células microbianas obtenidas centrifugando el microorganismo transformado o el cultivo se pueden tratar con un tensioactivo, lisozima o xileno.

Preferentemente, las células microbianas se pueden tratar con POESA al 0,1 %.

La solución que contiene D-galactosa, la cual se usa en la presente invención, se puede seleccionar del grupo que consiste en D-galactosa purificada, D-galactosa derivada de biomasa, y D-galactosa obtenida por hidrólisis de lactosa, pero no se limita a las mismas.

La arabinosa isomerasa es una metaloenzima que usa un ion metálico como cofactor. El ion metálico se puede seleccionar del grupo que consiste en iones de manganeso, iones de magnesio e iones de zinc, pero no está limitado, y puede ser cualquier ion metálico que se pueda unir a la isomerasa para realizar una reacción de isomerización. Específicamente, la fuente de ion de manganeso incluye cloruro de manganeso; la fuente de ion de

magnesio incluye cloruro de magnesio; y la fuente de ion de zinc incluye cloruro de zinc; sin embargo, el ámbito de la presente invención no se limita a estas fuentes de ion metálico.

Una solución de reacción para producir D-tagatosa contiene un sistema tampón para mantener el pH, tal como tampón Tris o tampón de fosfato. Preferentemente, contiene tampón Tris (pH 6,5 a 7,5). El cloruro de manganeso, cloruro de magnesio o cloruro de zinc está contenido a una concentración de 0,1 mM a 10 mM, y preferentemente 1 mM a 5 mM. La D-galactosa sustrato se añade en una cantidad de 1 a 300 g/l, y preferentemente 18 a 300 g/l, y la reacción de isomerización se induce a una temperatura de 60 °C a 95 °C, preferentemente 70 °C a 80 °C, y más preferentemente 72 °C a 78 °C, produciendo de ese modo D-tagatosa.

Más adelante en el presente documento, la presente invención se describirá a más detalle en referencia a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelado de la proteína arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* para la construcción de la enzima que tiene actividad de conversión incrementada y selección de las principales mutaciones de aminoácidos

Debido a que aún no se ha encontrado la estructura tridimensional de la arabinosa isomerasa tipo silvestre de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068, se realizó la predicción de la estructura tridimensional mediante una técnica de modelado molecular que usa, como modelo, la arabinosa isomerasa de *Escherichia coli* cuya estructura tridimensional ya se ha encontrado y que tiene una alta homología de secuencia. Para la predicción de la estructura tridimensional, se usó una técnica de modelado comparativa, y se obtuvo un modelo estructural usando un módulo APM (Tripos, USA) en un paquete de modelado molecular.

La técnica de modelado comparativa es un método que es el más frecuentemente usado para predecir las estructuras tridimensionales de las proteínas. Si la secuencia de aminoácidos de una proteína deseada es muy similar a la secuencia de otra proteína cuya estructura tridimensional se ha conocido, la estructura tridimensional de la proteína deseada se puede predecir fácilmente usando la técnica de modelado comparativa, y en este caso, la precisión de la predicción es muy alta.

La estructura de la arabinosa isomerasa de *E. coli* usada en este Ejemplo era una estructura tipo trímero registrada como 2HXG.pdb en el "Protein Data Bank" (PDB).

A partir de los resultados de modelado, se predijo que la arabinosa isomerasa tipo silvestre (que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6) de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 sería muy similar a la arabinosa isomerasa de *E. coli* en términos de no solamente la secuencia de nucleótidos, sino también las estructuras bi- y tridimensionales. Varios estudios sobre la arabinosa isomerasa de *E. coli* dieron información sobre el sitio de unión a sustrato, el ion de manganeso cofactor (Mn^{2+}) y los principales aminoácidos (Manjasetty & Chance, *J. Mol. Biol.*, 2006. 360:297-309). Basándose en dicha información, se seleccionaron los principales restos de isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068.

Para el análisis de los principales restos de aminoácidos, se realizaron alineamiento de secuencia, simulación de acoplamiento molecular, y análisis del mecanismo de reacción. El alineamiento de secuencia se realizó usando el algoritmo clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) basado en la información sobre las secuencias de 10 L-arabinosa isomerasas diferentes y la arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*.

Los resultados del alineamiento de secuencia sugieren que las secuencias del sitio de unión a metal y el sitio activo de la arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 estaban muy bien conservados, como aquellos de otras isomerasas. La isomerasa de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 tenía un sitio activo que comprendía restos de aminoácidos E302 (ácido glutámico en la posición 302), E329 (ácido glutámico en la posición 329), H346 (histidina en la posición 346) y H445 (histidina en la posición 445) e iones de manganeso (Figura 1), y los restos de aminoácidos E302, E329, H346 y H445 tenían efectos sobre la unión del ion de manganeso. Particularmente, se predijo que los restos de E302 y E329 eran los factores más importantes que promueven una reacción de isomerización (Manjasetty & Chance, *J. Mol. Biol.*, 2006. 360:297-309).

Se asumió que la especificidad de sustrato de la arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* se determinaría según el tamaño y la morfología del sitio activo y las características de los restos de aminoácidos del sitio activo. A través de la simulación de acoplamiento molecular (surflexDock; Tripos, USA) realizada usando la L-arabinosa sustrato original, se seleccionaron los restos importantes en el reconocimiento de sustrato. Además, a través del análisis del mecanismo de reacción (Adrian J. Mulholland, *Drug Discov. Today*, 2005. 10(20):1.393-402), se seleccionó la posición de unión más adecuada de la D-galactosa. Basándose en esta selección, se seleccionó un resto de aminoácido que tenía una alta posibilidad de interferir con la unión entre el sitio activo de la arabinosa isomerasa y la D-galactosa.

El aminoácido en la posición 275 consistía en fenilalanina que tiene una cadena lateral aromática y es relativamente grande en tamaño y menos flexible, y se predijo que el aminoácido en la posición 275 causaría impedimento estérico con el carbono 6 de la D-galactosa (Figura 2). Debido a la L-arabinosa, una pentosa, muestra básicamente la misma estructura que la D-galactosa, excepto que el número de átomos de carbono es más pequeño que el de la D-galactosa por uno, se anticipó que la reactividad de la arabinosa isomerasa con D-galactosa se podría incrementar significativamente incluso por solamente la sustitución del aminoácido en la posición 275 con otro aminoácido.

Como aminoácidos capaces de sustituir fenilalanina, se seleccionaron valina, metionina e isoleucina, los cuales tienen polaridad a la de fenilalanina, son relativamente pequeños en tamaño y altamente flexibles, y así se predice que tienen menos efecto sobre la estructura global de la arabinosa isomerasa mientras que se minimiza la repulsión con el carbono 6 de la D-galactosa.

Debido a que estos aminoácidos seleccionados están compuestos de una cadena alifática no polar, a diferencia de la fenilalanina que comprende una cadena aromática, se anticipó que estos aminoácidos podrían sustituir para fenilalanina mientras estuvieran estructuralmente libres.

Las estructuras de las variantes (que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a 5 y secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 a 10) que tienen mutaciones puntuales se predijeron por una técnica de modelado molecular. Como resultado, se predijo que el efecto de las mutaciones sobre la estructura global de la arabinosa isomerasa sería insignificante.

Además, a través de la mutagénesis al azar realizada usando la arabinosa isomerasa tipo silvestre a partir de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 usando un molde, se obtuvieron variantes que mostraban características enzimáticas mejoradas e información genética sobre las variantes. Las variantes se analizaron en conjunto, y como resultado, se encontró que la variación en la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la arabinosa isomerasa tenía un incremento en la actividad enzimática.

El fenómeno de que la estructura de la cadena de la región C-terminal de la arabinosa isomerasa está muy cambiada se analizó mediante una técnica de predicción molecular. Como resultado, se anticipó que la reactividad de la arabinosa isomerasa con D-galactosa se puede incrementar significativamente incluso por solamente la sustitución de prolina para leucina en la posición 469 de la arabinosa isomerasa tipo silvestre.

Ejemplo 2: Preparación de las variantes diseñadas de arabinosa isomerasa

(1) Sustitución de prolina para leucina en la posición 469

La leucina en la posición 469 de la arabinosa isomerasa tipo silvestre de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 se sustituyó con prolina mediante un método de mutagénesis dirigida usando cebadores específicos.

Como cebadores, se usaron el cebador N-terminal (SEQ ID NO: 13) y un cebador C-terminal (SEQ ID NO: 14), los cuales son oligonucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias con una mutación. Al usar un ADN plásmido como molde, se amplificó y sintetizó un plásmido que tenía una nueva mutación en un tubo de ensayo y, a continuación, se separó el ADN tipo silvestre mediante escisión con una enzima de restricción *Dpn* I. En otras palabras, el ADN tipo silvestre usado como molde era un ADN aislado a partir de *E. coli* y estaba digerido con *Dpn* I que reconoce y escinde Gm6ATC, pero el ADN sintetizado en el tubo de ensayo no estaba escindido.

El ADN se transformó dentro de *E. coli* DH5 alfa para obtener un gen variante y, a continuación, la secuencia de nucleótidos del gen variante se analizó para confirmar que la mutación se daba apropiadamente. El gen variante se transformó dentro de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 para producir una cepa recombinante que entonces se denominó L469P. La cepa recombinante se usó como control.

(2) Sustitución de aminoácidos distintos de fenilalanina para el aminoácido en la posición 275

Para inducir una mutación adicional en la variante construida L469P, un vector clonado con isomerasa se sometió a mutagénesis saturada usando un par de cebadores que contenían una mutación.

El par cebador diseñado se diseñó de modo que el codón de aminoácido en la posición 275 se sustituiría con NNS (N: A, T, G o C; y S: G o C). Las variantes obtenidas por este método pueden comprender 20 tipos de aminoácidos (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12). Tales variantes proporcionaron colonias sencillas mediante transformación, y los cambios en la actividad por las 20 mutaciones de aminoácidos en las correspondientes posiciones se podrían confirmar sin pérdida cribando las colonias sencillas y analizando sus actividades.

Específicamente, para producir una genoteca que comprenda 20 tipos de aminoácidos, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando 100 µl/ml de un plásmido pECCG117-CJ1-TNAI_L469P (publicación abierta a inspección pública de patente coreana N° 10-2010-0016948) como molde y cebadores directos e inversos. La reacción PCR se realizó bajo las condiciones mostradas en las Tablas 1 y 2 de más adelante. La genoteca obtenida

por la reacción PCR se transformó dentro de una cepa K12 DH5 α de *E. coli* para producir colonias. El plásmido usado se expresó en la cepa de *E. coli* y se ensayó su actividad en la cepa de *E. coli*, debido a que se podría replicar y expresar en tanto *E. coli* como bacteria tipo Coryne.

5 Las actividades de las isomerasas expresadas a partir de 110 colonias obtenidas como se describió se analizaron por un método de cisteína-carbazol (Dische, Z., y E. Borenfreund., "A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses", *J. Biol. Chem.*, 192:583-587, 1951), y como resultado, se podría encontrar un número de clones que tienen una actividad mayor que la del control (L469P) (Figura 3).

10 Entre ellas, se seleccionaron y secuenciaron 10 colonias medidas para tener la actividad más alta. Como resultado, como se esperaba, se pudo ver que la actividad era mayor para valina, metionina e isoleucina (secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 a 5 y secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 a 10). Además, no se encontraron mutaciones en los aminoácidos distintos del aminoácido en la posición 275, sugiriendo que el resto de fenilalanina en la posición 275 funciona para inhibir la reactividad de la D-galactosa.

15 Para examinar si la mutación tiene algún efecto sobre la isomerasa, las estructuras de las variantes se predijeron por una técnica de modelado molecular (Figura 4). Los resultados de la predicción de las estructuras indicaron que todos los tres aminoácidos sustituyeron para la fenilalanina en la posición 275 sin causar cambios significativos en las estructuras bi- y tridimensionales. Por tanto, se podría anticipar que la reactividad de la isomerasa con D-galactosa incrementaría sin incrementos significativos en la estabilidad térmica y otros índices de producción.

20 Las variantes se transformaron dentro de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 para producir cepas recombinantes. Las cepas recombinantes se denominaron "*Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-TNAI-2, pFIS-1-TNAI-3 y pFIS-1-TNAI-4", respectivamente, y se depositaron en el "Korean Culture Center of Microorganisms" (361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea del Sur), una autoridad de depósito internacional, el 14 de febrero de 2013 bajo los números de acceso KCCM11378P, KCCM11379P y KCCM11380P, respectivamente.

Tabla 1: PCR de mutagénesis saturada

Composición de la solución de reacción	Cantidad (μ l) añadida
Tampón de PCR (pfu-ultra) 10x	5
dNTP (2,5 mM)	5
pCJ1-TNAI L469P	1
Cebador TNAI275_F	1
Cebador TNAI275_R	1
pfu-ultra	1
agua doblemente destilada	Hasta 50 μ l

30 Tabla 2: condiciones de la reacción PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	18
Alineamiento	60 °C	45 s	
Extensión	68 °C	18 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1

Ejemplo 3: Expresión de las variantes de arabinosa isomerasa en microorganismos del género *Corynebacterium*

35 Para medir el grado de incrementos en las actividades de las variantes seleccionadas y la aplicabilidad de las variantes a la producción actual de D-tagatosa, las tres variantes se expresaron en microorganismos del género *Corynebacterium*, y se realizaron estudios sobre índices relacionados con la productividad y la producción.

40 Las tres variantes seleccionadas en el Ejemplo 2 se transformaron en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 para producir cepas recombinantes. Estas cepas recombinantes se cultivaron en medios (20 g/l de glucosa, 10 g/l de poli peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de sulfato de amonio, 5,2 g/l de KH₂PO₄, 10,7 g/l de K₂HPO₄, 0,5 g/l de MgSO₄, 1,5 g/l de urea, 1,8 mg/l de D-biotina, 9 mg/l de tiamina, 9 mg/l de Ca-pantoténico, 60 mg/l de niacinamida) que contienen 50 μ g/ml de kanamicina a 30 °C durante 20 horas para inducir la expresión de los mutantes recombinantes de arabinosa isomerasa.

45 Para medir la actividad de las arabinosa isomerasas expresadas, los cultivos se centrifugaron a 8.000 fuerza g durante 10 minutos para recoger las células bacterianas que, a continuación, se suspendieron de nuevo en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Las células suspendidas se trataron con POESA al 0,1 % a temperatura ambiente durante 1 hora para debilitar la pared celular. A continuación, se realizó la centrifugación de nuevo bajo las condiciones anteriormente descritas para recoger las células que, a continuación, se suspendieron de nuevo en una solución mezclada de 300 g/l de D-galactosa, cloruro de manganeso 5 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) para una concentración de 4 % (p/v). La suspensión se dejó reaccionar a 75 °C durante 1 hora, y se realizó el análisis por HPLC (WATERS

HPLC, EMPOWER system, columna de 300 mm de 6,5 l SugarPak ID de WATERS, detector de índice de refracción 2414) para la cuantificación de D-galactosa y D-tagatosa.

5 Los resultados de una hora de la reacción indicaron que el control L469P producía 35 g/l de D-galactosa, mientras que la variante F275V/L469P mostraba una productividad de 121 g/l·h, la variante F275M/L469P mostraba una productividad de 117 g/l·h, y la variante F275I/L469P mostraba 101 g/l·h.

Ejemplo 4: Aislamiento de las variantes de arabinosa isomerasa expresadas en bacteria Coryne

10 Se sembraron 200 ml de la cepa recombinante que comprende cada una de las tres variantes (F275V/L469P, F275M/L469P, y TNAI-F275I/L469P) cuyas actividades se confirmaron, y el control L469P, en un matraz de 2 l bajo las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo 3. Para examinar si se expresaban las arabinosa isomerasas, las actividades de las isomerasas se midieron usando una parte de cada uno de los cultivos bajo las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 3.

15 Las células bacterianas obtenidas de cada uno de los cultivos se suspendieron de nuevo en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de manganeso 0,1 mM, y se lisaron usando un homogeneizador serie T de célula a alta presión (4.0 kW: Constant systems, GB). Para separar las proteínas endógenas distintas de las isomerasas, las células se trataron con calor a 75 °C durante 20 minutos. Los residuos de las células tratadas con calor se separaron por centrifugación a 8.000 fuerza g durante 10 minutos y, a continuación, los residuos y los lípidos celulares se separaron más por ultracentrifugación (ultracentrífuga Optima L-80 XP de BECKMAN COULTER) a 60.000 fuerza g.

20 El extracto celular resultante se purificó por cromatografía de intercambio aniónico (Mono QTM 10/100GL, GE Healthcare). El extracto celular purificado se calibró previamente con una solución de unión (NaCl 50 mM, cloruro de manganeso 0,1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y, a continuación, una cantidad en exceso del extracto celular se unió y fraccionó mientras que se incrementaba la relación de una solución eluyente [NaCl 1 M, cloruro de manganeso 0,1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5)]. Las fracciones que muestran actividad para la D-galactosa sustrato se seleccionaron a través del método de cisteína-carbazol-ácido sulfúrico y, a continuación, se analizaron por SDS-PAGE.

25 Como resultado, se podría ver que la proteína purificada tenía un peso molecular de aproximadamente 56 kDa, lo cual es coherente con el peso molecular conocido de arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*. Una fracción que tiene el grado más alto de purificación se seleccionó por SDS-PAGE, y se separó una alta concentración de NaCl de la misma usando una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare). La enzima purificada resultante se analizó por SDS-PAGE (Figura 5). La proteína aislada y purificada se cuantificó usando un ensayo Bradford, y se usó BSA (albúmina de suero bovino) como una proteína patrón.

35

Ejemplo 5: estudios sobre la caracterización de las variantes de arabinosa isomerasa

40 Se encontró que las tres variantes de arabinosa isomerasa preparadas en el ejemplo anterior mostraron actividades significativamente incrementadas en comparación con la variante que tenía una sustitución de prolina para leucina en la posición 469. Basándose en este descubrimiento, se realizaron experimentos sobre los parámetros relacionados con las condiciones de reacción que tienen efectos sobre la producción actual de D-tagatosa.

5-1: Estudio sobre la temperatura óptima

45 La arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*, una enzima termófila, tiene estabilidad térmica relativamente alta y la temperatura óptima. La temperatura adecuada para producir D-tagatosa a partir de D-galactosa está entre 55 °C y 75 °C. A una temperatura inferior de 55 °C, se darán problemas resultantes de la contaminación con cepas heterólogas, y a una temperatura mayor de 75 °C, los problemas surgirán en términos de la estabilidad de la D-tagatosa producida. La arabinosa isomerasa tipo silvestre o el control L469P, la temperatura de reacción óptima de los cuales es de 85 °C, tenía un problema en el sentido de que muestra actividad relativamente baja a una temperatura a la cual el proceso de producción es aplicable.

50 Para examinar las temperaturas óptimas de las variantes de arabinosa isomerasa purificadas en el Ejemplo 4, se añadió cada una de las enzimas purificadas a D-galactosa sustrato 100 mM, y su actividad se midió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de manganeso 1 mM (MnCl₂) a una temperatura que oscilaba de 60 °C a 90 °C a intervalos de 5 °C.

55 La medición de la actividad se realizó mediante un método de cisteína-carbazol. Como se muestra en la Figura 6, los resultados de la medición de la actividad enzimática en función de la temperatura indicaron que la temperatura de reacción óptima de las tres variantes de arabinosa isomerasa era de 75 °C, la cual era 10 °C menor que la de L469P. Por tanto, se encontró que la actividad de las isomerasas en el intervalo de temperatura en el cual el proceso de producción es aplicable generalmente sería alto y que el intervalo de temperatura de aplicación del proceso de producción sería más amplio.

60

65

Además, las tres variantes mostraron patrones de temperatura similares, sugiriendo que las características del resto de fenilalanina en la posición 275 tienen efectos sobre la temperatura de reacción óptima. Por tanto, se puede ver que la suficiente flexibilidad se debería asegurar de manera que el impedimento estérico de fenilalanina en la posición 275 con D-galactosa durante la reacción de la isomerasa con D-galactosa se puede minimizar. Ya que la temperatura incrementa, la movilidad molecular del resto de fenilo de fenilalanina y los restos circundantes pueden ser más activos y, por tanto, se puede reducir el impedimento estérico con el carbono 6 de D-galactosa. Al mismo tiempo, se puede anticipar que la temperatura óptima se puede formar dentro de un intervalo que no influye significativamente las estructuras de tres y cuatro dimensiones de la proteína. Por tanto, puede haber un cambio en la temperatura óptima de las variantes cuyo impedimento estérico se ha reducido básicamente mediante la mutación en la posición 275. Sin embargo, se requiere que el análisis adicional y los experimentos aprueben científicamente este hecho.

5-2: Estudio sobre la estabilidad térmica

Para examinar la estabilidad térmica de las variantes de arabinosa isomerasa, cada una de las enzimas se añadió a una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y cloruro de manganeso 1 mM a una concentración de 20 µg/ml y se incubaron en un baño de agua de temperatura constante a 95 °C durante 180 minutos. Se realizó una reacción enzimática usando una solución enzimática muestreada a momentos variantes para medir la actividad residual de la enzima.

Como se muestra en la Figura 7, los resultados del examen de la estabilidad térmica indicaron que las variantes de arabinosa isomerasa mostraban un descenso en la actividad residual con el tiempo a 95 °C, pero la diferencia en la estabilidad térmica entre las variantes no era significativa. Para obtener más datos cuantitativos, se midió la semivida del activo de cada variante. Como resultado, se encontró que L469P tenía una semivida de aproximadamente 3 horas, y las variantes que tenían la mutación en la posición 275 tenían una semivida de aproximadamente 2 horas (Tabla 3). Las estabilidades térmicas de las variantes que tenían la mutación en la posición 275 se midieron para ser relativamente bajas, pero se cree que la diferencia en la estabilidad térmica no es significativa y se puede compensar suficientemente mediante el incremento en la actividad y el descenso en la temperatura del proceso.

Tabla 3: Semividas de las arabinosas isomerasas, medidas a 95 °C

Variante	Semivida (minutos)
L469P	185
F275V/L469P	122
F275M/L469P	126
F275I/L469P	134

5-3: Estudio sobre el cambio en la actividad causado por el efecto de los iones metálicos

Muchas enzimas requieren iones metálicos para la catálisis. Por esta razón, para examinar la dependencia de la estabilidad térmica de las variantes de arabinosa isomerasa de la presente invención sobre los iones metálicos, el cambio en la actividad de las variantes por iones metálicos se examinaron usando cada una de las enzimas purificadas.

Para examinar el cambio en la actividad de la enzima en función de la concentración de la enzima, cada una de las enzimas purificadas se añadieron a D-galactosa sustrato 100 mM, y la actividad de cada enzima se midió en una solución de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía 1 a 5 mM de cloruro de manganeso (MnCl₂) a 75 °C durante 10 minutos (Figura 8). Como resultado, se podría ver que todas las variantes mostraban actividades similares dentro del intervalo de concentración de cloruro de manganeso usado en el experimento y que el efecto de los iones de manganeso sobre la actividad de las isomerasas a la concentración de cloruro de manganeso esencial para la actividad de la enzima no era significativo.

5.4: Estudio sobre la actividad de las enzimas

Para examinar los índices de reacción de las enzimas, las actividades específicas de las variantes de arabinosa isomerasa se midieron a una temperatura de reacción de 75 °C. Específicamente, se añadió cada una de las enzimas a cloruro de manganeso 1 mM y D-galactosa 100 mM, y la reactividad de 1 mg de la enzima se midió a pH 7,5 y 75 °C. La actividad específica de cada enzima durante la reacción se midió bajo las anteriores condiciones durante 10 minutos, y como resultado, se mostró que las actividades específicas de las variantes que tenían la mutación en la posición 275 era aproximadamente 5,5 veces (F275V), 5 veces (F275M) y 3,9 veces (F275I), respectivamente, mayor que las de L469P (Tabla 4).

Tabla 4: Actividades específicas de las variantes

	L469P	F275V/L469P	F275M/L469P	F275I/L469P
Actividad específica (U/mg)	2,4	13,1	12,1	9,3

Números de acceso

- 5
- Autoridad de depósito: Korean Culture Center of Microorganisms;
 Número de acceso: KCCM11378P;
 Fecha de depósito: 14 de febrero de 2013.
- 10
- Autoridad de depósito: Korean Culture Center of Microorganisms;
 Número de acceso: KCCM11379P;
 Fecha de depósito: 14 de febrero de 2013.
- Autoridad de depósito: Korean Culture Center of Microorganisms;
 Número de acceso: KCCM11380P;
 Fecha de depósito: 14 de febrero de 2013.
- 15
- <110> CJ Cheiljedang Corporation
- <120> variantes de L-arabinosa isomerasa con actividad de conversión mejorada y método para la producción de D-tagatosa usándolas
- 20
- <130> PP14-0114
- <160> 14
- 25
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
 <211> 496
 <212> PRT
- 30
- <212> *Thermotoga neapolitana*
- <400>1

ES 2 678 022 T3

Met Ile Asp Leu Lys Gln Tyr Glu Phe Trp Phe Leu Val Gly Ser Gln
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Gly Leu Glu Thr Leu Lys Lys Val Glu Gln Gln Ala Ser
20 25 30

Arg Ile Val Glu Ala Leu Asn Asn Asp Pro Ile Phe Pro Ser Lys Ile
35 40 45

Val Leu Lys Pro Val Leu Lys Asn Ser Ala Glu Ile Arg Glu Ile Phe
50 55 60

Glu Lys Ala Asn Ala Glu Pro Lys Cys Ala Gly Val Ile Val Trp Met
65 70 75 80

His Thr Phe Ser Pro Ser Lys Met Trp Ile Arg Gly Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Lys Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Tyr Asn Arg Glu Ile Pro
100 105 110

Trp Asp Thr Ile Asp Met Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
115 120 125

Gly Asp Arg Glu His Gly Phe Ile His Ala Arg Met Arg Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Arg Glu Val Arg Glu Lys Ile
145 150 155 160

Ala Lys Trp Met Arg Val Ala Cys Ala Ile Gln Asp Gly Arg Thr Gly
165 170 175

Gln Ile Val Arg Phe Gly Asp Asn Met Arg Glu Val Ala Ser Thr Glu
180 185 190

Gly Asp Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Leu Gly Trp Ser Ile Asn Thr
195 200 205

Trp Gly Val Gly Glu Leu Ala Glu Arg Val Lys Ala Val Pro Glu Asn
210 215 220

Glu Val Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Glu Arg Tyr Ile Met Pro
225 230 235 240

Glu Asp Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Ile Arg Glu Gln Ala Lys Met Glu

ES 2 678 022 T3

				245						250					255
Ile	Ala	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Asn	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr
			260					265					270		
Thr	Thr	Phe	Glu	Asp	Leu	His	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala
		275					280					285			
Val	Gln	Arg	Leu	Met	Glu	Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly	Asp
	290						295				300				
Trp	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Leu	Lys	Val	Met	Gly	Ala	Gly
305					310					315					320
Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Phe	Met	Glu	Asp	Tyr	Thr	Tyr	His	Leu	Thr
				325					330					335	
Pro	Gly	Asn	Glu	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	His	Met	Leu	Glu	Val	Cys	Pro
			340					345					350		
Thr	Ile	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Arg	Ile	Glu	Val	His	Pro	Leu	Ser	Ile
		355					360					365			
Gly	Gly	Lys	Ala	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Val	Phe	Asp	Gly	Gln	Glu	Gly
	370					375					380				
Pro	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Asp	Met	Gly	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu
385					390					395					400
Val	Val	Asn	Arg	Val	Leu	Ser	Val	Pro	Ile	Glu	Arg	Lys	Met	Pro	Lys
				405					410					415	
Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Val	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Phe	Lys	Arg
			420					425					430		
Ala	Thr	Thr	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	His	His	Thr	Ala	Phe
		435					440					445			
Ser	Thr	Ala	Val	Asp	Val	Glu	Tyr	Leu	Ile	Asp	Trp	Ala	Glu	Ala	Leu
	450					455					460				
Glu	Ile	Glu	Tyr	Leu	Val	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Asp	Leu	Glu	Asn	Phe
465					470					475					480
Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Trp	Asn	Glu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Leu	Leu	Lys	Arg
				485					490					495	

<210>2
 <211> 496
 <212> PRT
 <212> *Thermotoga neapolitana*

5

<400>2

Met	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Phe	Trp	Phe	Leu	Val	Gly	Ser	Gln
1				5					10					15	
Tyr	Leu	Tyr	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys	Val	Glu	Gln	Gln	Ala	Ser
			20					25					30		
Arg	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Asp	Pro	Ile	Phe	Pro	Ser	Lys	Ile

10

ES 2 678 022 T3

370						375										380
Pro	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Asp	Met	Gly	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu	
385					390					395					400	
Val	Val	Asn	Arg	Val	Leu	Ser	Val	Pro	Ile	Glu	Arg	Lys	Met	Pro	Lys	
				405					410					415		
Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Val	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Phe	Lys	Arg	
			420					425					430			
Ala	Thr	Thr	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	His	His	Thr	Ala	Phe	
			435				440						445			
Ser	Thr	Ala	Val	Asp	Val	Glu	Tyr	Leu	Ile	Asp	Trp	Ala	Glu	Ala	Leu	
	450					455					460					
Glu	Ile	Glu	Tyr	Pro	Val	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Asp	Leu	Glu	Asn	Phe	
465					470					475					480	
Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Trp	Asn	Glu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Leu	Leu	Lys	Arg	
				485					490					495		

<210>3
 <211> 496
 <212> PRT
 <212> *Thermotoga neapolitana*
 <400>3

5

ES 2 678 022 T3

Met Ile Asp Leu Lys Gln Tyr Glu Phe Trp Phe Leu Val Gly Ser Gln
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Gly Leu Glu Thr Leu Lys Lys Val Glu Gln Gln Ala Ser
20 25 30

Arg Ile Val Glu Ala Leu Asn Asn Asp Pro Ile Phe Pro Ser Lys Ile
35 40 45

Val Leu Lys Pro Val Leu Lys Asn Ser Ala Glu Ile Arg Glu Ile Phe
50 55 60

Glu Lys Ala Asn Ala Glu Pro Lys Cys Ala Gly Val Ile Val Trp Met
65 70 75 80

His Thr Phe Ser Pro Ser Lys Met Trp Ile Arg Gly Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Lys Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Tyr Asn Arg Glu Ile Pro
100 105 110

Trp Asp Thr Ile Asp Met Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
115 120 125

Gly Asp Arg Glu His Gly Phe Ile His Ala Arg Met Arg Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Arg Glu Val Arg Glu Lys Ile
145 150 155 160

Ala Lys Trp Met Arg Val Ala Cys Ala Ile Gln Asp Gly Arg Thr Gly

ES 2 678 022 T3

					165						170					175
Gln	Ile	Val	Arg	Phe	Gly	Asp	Asn	Met	Arg	Glu	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	
			180					185					190			
Gly	Asp	Lys	Val	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Ile	Asn	Thr	
		195					200					205				
Trp	Gly	Val	Gly	Glu	Leu	Ala	Glu	Arg	Val	Lys	Ala	Val	Pro	Glu	Asn	
	210					215					220					
Glu	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Ile	Met	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Asp	Glu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Met	Glu	
				245					250					255		
Ile	Ala	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Asn	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	
			260						265					270		
Thr	Thr	Val	Glu	Asp	Leu	His	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	
		275					280					285				
Val	Gln	Arg	Leu	Met	Glu	Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly	Asp	
	290					295					300					
Trp	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Leu	Lys	Val	Met	Gly	Ala	Gly	
305					310					315					320	
Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Phe	Met	Glu	Asp	Tyr	Thr	Tyr	His	Leu	Thr	
				325					330					335		
Pro	Gly	Asn	Glu	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	His	Met	Leu	Glu	Val	Cys	Pro	
			340					345					350			
Thr	Ile	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Arg	Ile	Glu	Val	His	Pro	Leu	Ser	Ile	
		355					360					365				
Gly	Gly	Lys	Ala	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Val	Phe	Asp	Gly	Gln	Glu	Gly	
	370					375					380					
Pro	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Asp	Met	Gly	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu	
385					390					395					400	
Val	Val	Asn	Arg	Val	Leu	Ser	Val	Pro	Ile	Glu	Arg	Lys	Met	Pro	Lys	
				405					410					415		
Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Val	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Phe	Lys	Arg	
			420					425					430			
Ala	Thr	Thr	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	His	His	Thr	Ala	Phe	
		435					440					445				
Ser	Thr	Ala	Val	Asp	Val	Glu	Tyr	Leu	Ile	Asp	Trp	Ala	Glu	Ala	Leu	
	450					455					460					
Glu	Ile	Glu	Tyr	Pro	Val	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Asp	Leu	Glu	Asn	Phe	
465					470					475					480	
Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Trp	Asn	Glu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Leu	Leu	Lys	Arg	
				485					490					495		

<210>4
<211>496
<212>PRT
<212>*Thermotoga neapolitana*

5

<400>4

ES 2 678 022 T3

Met Ile Asp Leu Lys Gln Tyr Glu Phe Trp Phe Leu Val Gly Ser Gln
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Gly Leu Glu Thr Leu Lys Lys Val Glu Gln Gln Ala Ser
20 25 30

Arg Ile Val Glu Ala Leu Asn Asn Asp Pro Ile Phe Pro Ser Lys Ile
35 40 45

Val Leu Lys Pro Val Leu Lys Asn Ser Ala Glu Ile Arg Glu Ile Phe
50 55 60

Glu Lys Ala Asn Ala Glu Pro Lys Cys Ala Gly Val Ile Val Trp Met
65 70 75 80

His Thr Phe Ser Pro Ser Lys Met Trp Ile Arg Gly Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Lys Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Tyr Asn Arg Glu Ile Pro
100 105 110

Trp Asp Thr Ile Asp Met Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
115 120 125

Gly Asp Arg Glu His Gly Phe Ile His Ala Arg Met Arg Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Arg Glu Val Arg Glu Lys Ile
145 150 155 160

Ala Lys Trp Met Arg Val Ala Cys Ala Ile Gln Asp Gly Arg Thr Gly
165 170 175

Gln Ile Val Arg Phe Gly Asp Asn Met Arg Glu Val Ala Ser Thr Glu
180 185 190

Gly Asp Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Leu Gly Trp Ser Ile Asn Thr
195 200 205

Trp Gly Val Gly Glu Leu Ala Glu Arg Val Lys Ala Val Pro Glu Asn
210 215 220

Glu Val Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Glu Arg Tyr Ile Met Pro
225 230 235 240

Glu Asp Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Ile Arg Glu Gln Ala Lys Met Glu
245 250 255

Ile Ala Leu Arg Glu Phe Leu Lys Glu Lys Asn Ala Ile Ala Phe Thr
260 265 270

Thr Thr Met Glu Asp Leu His Asp Leu Pro Gln Leu Pro Gly Leu Ala
275 280 285

Val Gln Arg Leu Met Glu Glu Gly Tyr Gly Phe Gly Ala Glu Gly Asp

ES 2 678 022 T3

```

                290                      295                      300
Trp Lys Ala Ala Gly Leu Val Arg Ala Leu Lys Val Met Gly Ala Gly
305                      310                      315                      320
Leu Pro Gly Gly Thr Ser Phe Met Glu Asp Tyr Thr Tyr His Leu Thr
                      325                      330                      335
Pro Gly Asn Glu Leu Val Leu Gly Ala His Met Leu Glu Val Cys Pro
                      340                      345                      350
Thr Ile Ala Lys Glu Lys Pro Arg Ile Glu Val His Pro Leu Ser Ile
                      355                      360                      365
Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ala Arg Leu Val Phe Asp Gly Gln Glu Gly
370                      375                      380
Pro Ala Val Asn Ala Ser Ile Val Asp Met Gly Asn Arg Phe Arg Leu
385                      390                      395                      400
Val Val Asn Arg Val Leu Ser Val Pro Ile Glu Arg Lys Met Pro Lys
                      405                      410                      415
Leu Pro Thr Ala Arg Val Leu Trp Lys Pro Leu Pro Asp Phe Lys Arg
                      420                      425                      430
Ala Thr Thr Ala Trp Ile Leu Ala Gly Gly Ser His His Thr Ala Phe
435                      440                      445
Ser Thr Ala Val Asp Val Glu Tyr Leu Ile Asp Trp Ala Glu Ala Leu
450                      455                      460
Glu Ile Glu Tyr Pro Val Ile Asp Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asn Phe
465                      470                      475                      480
Lys Lys Glu Leu Arg Trp Asn Glu Leu Tyr Trp Gly Leu Leu Lys Arg
                      485                      490                      495

```

<210>5
 <211> 496
 <212> PRT
 <212> *Thermotoga neapolitana*

5

<400>5

```

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

```

10

ES 2 678 022 T3

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

<210>6
 <211> 1491
 <212>ADN
 <212> *Thermotoga neapolitana*

5

<400>6

atgatcgatc	tcaaacagta	tgagttctgg	tttcttgtcg	gcagccagta	tctctacggt	60
ctggagacgt	tgaagaaggt	agagcagcag	gcaagcagga	tagttgaggc	actgaacaat	120
gatcccattt	ttcctcaaaa	gatcgttctg	aaaccogttc	tgaaaaattc	cgccgagatc	180
agagagatct	tcgaaaaggc	aatgcagaa	ccaaaatgcg	ccggtgtcat	cgtgtggatg	240
cacacgttct	caccttcgaa	gatgtggata	agaggcctct	ccatcaataa	aaaaccctg	300
cttcacctcc	acaccagta	caacaggag	atcccgtggg	acacgatcga	tatggactac	360
atgaacctga	accaatctgc	ccacggtgac	aggaacacg	gattcattca	cgcgaggatg	420
agactcccaa	gaaaggtcgt	ggtgggacat	tgggaagaca	gagaagtcag	ggaaaagatc	480
gcaaaatgga	tgagagtggc	ctgcgcgata	caggatggaa	gaactggaca	gatcgtgaga	540
ttcggcgata	acatgagaga	ggttgccagc	accgaaggag	acaaggtgga	ggcacagata	600
aaactcggct	ggtccataaa	cacctggggt	gtcggagagc	tcgccgagag	agtgaaggcg	660
gttcagaaa	acgaagtgga	ggaattgttg	aaggagtaca	aagaaaggtg	catcatgcca	720
gaagacgaat	acagcctcaa	agcgatcaga	gaacaggcga	agatggagat	tgcaactgaga	780
gagtttctga	aagagaagaa	tgccatcgcc	ttcaccacca	ccttcgagga	tottcacgat	840
cttccccagc	ttcccggctc	tgcagtccag	aggctcatgg	aggaagggtg	tggatttggg	900
gcggaaggag	actggaaggc	agccgggctt	gtgagggctt	tgaaggtcat	gggagctggt	960
cttcccggtg	gtacatcctt	catggaggac	tacacctacc	atctcacacc	gggaaacgaa	1020
ctcgtgctgg	gagcgcacat	gctagagggtg	tgccccacga	tcgctaagga	aaagccaaga	1080
atagaggtgc	atcctctcag	catcgggtgga	aaagcagatc	ctgcacgcct	tgttttcgat	1140
ggacaagaag	gtcccgctgt	caacgcctcc	atcgttgaca	tgggaaacag	gttcaggctg	1200

10

ES 2 678 022 T3

gtagtgaaca gagtgttgtc cgttcccatt gaaaggaaga tgcccaaact tccaacggca	1260
agagttttgt ggaagccgct tcctgatttc aagagggcga cgactgcgtg gattctcgt	1320
ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactgg	1380
gCGgaggctt tggagataga gtatcttgtc atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc	1440
aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tggggacttt taaaaagatg a	1491

5 <210>7
<211> 1491
<212> ADN
<212> *Thermotoga neapolitana*

<400>7

ES 2 678 022 T3

atgatcgate tcaaacagta tgagttctgg tttcttgctg gcagccagta tctctacggt 60
 ctggagacgt tgaagaaggt agagcagcag gcaagcagga tagttgaggg actgaacaat 120
 gatoccattt ttccctcaaa gatcgttctg aaaccctgtc tgaaaaatto cgccgagatc 180
 agagagatct tcgaaaaggc aaatgcagaa ccaaaatgcg cgggtgtcat cgtgtggatg 240
 cacacgttct caccttcgaa gatgtggata agaggcctct ccatcaataa aaaaccctg 300
 cttcacctcc acaccagta caacagggag atcccgtggg acacgatcga tatggactac 360
 atgaacctga accaatctgc ccacgggtgac agggaacacg gattcattca cgcgaggatg 420
 agaactccaa gaaaggtcgt ggtgggacat tgggaagaca gagaagtcat ggaaaagatc 480
 gcaaaatgga tgagagtggc ctgcgcgata caggatggaa gaactggaca gatcgtgaga 540
 ttccggcgata acatgagaga ggttgccagc accgaaggag acaaggtgga ggcacagata 600
 aaactcggct ggtccataaa cacctggggt gtcggagagc tcgccgagag agtgaaggcg 660
 gttccagaaa acgaagtgga ggaattgttg aaggagtaca aagaaaggta catcatgcca 720
 gaagacgaat acagcctcaa agcgcacaga gaacagggca agatggagat tgcactgaga 780
 gagtttctga aagagaagaa tgccatcgcc ttcaccacca ccttcgagga tcttcaogat 840
 cttcccagc ttcccggctt tgcagtcagc aggcctcatg aggaagggtg tggatttggg 900
 ggggaaggag actggaaggc agccgggctt gtgagggctt tgaaggtcat gggagctggt 960
 cttcccggtg gtacatcctt catggaggac tacacctacc atctcacacc gggaaacgaa 1020
 ctcgtgctgg gagcgcacat gctagaggtg tgccccacga tcgctaagga aaagccaaga 1080
 atagagggtc atcctctcag catcgggtgga aaagcagatc ctgcacgcct tgttttcgat 1140
 ggacaagaag gtcccgtgt caacgcctcc atcgttgaca tgggaaacag gttcaggctg 1200
 gtagtgaaca gagtgttgc cgttccatt gaaaggaaga tgcccaact tccaacggca 1260
 agagtttgt ggaagcogct tcttgattc aagagggcga cgactgcgtg gattctcgt 1320
 ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactg 1380

 gccgaggctt tggagataga gtatcctgct atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc 1440
 aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tggggacttt taaaaagatg a 1491

<210>8
 <211> 1491
 <212> ADN
 <212> *Thermotoga neapolitana*

 <400>8

5

ES 2 678 022 T3

atgatcgatc tcaaacagta tgagttctgg tttcttgtcg gcagccagta tctctacggt 60
 ctggagacgt tgaagaaggt agagcagcag gcaagcagga tagttgaggc actgaacaat 120
 gatcccattt ttccctcaaa gatcgttctg aaacccttc tgaaaaattc cgccgagatc 180
 agagagatct tcgaaaaggc aatgcagaa ccaaaatgcg ccggtgtcat cgtgtggatg 240
 cacacgttct caccttcgaa gatgtggata agaggcctct ccatcaataa aaaaccctg 300
 cttcacctcc acaccagta caacagggag atcccgtggg acacgatcga tatggactac 360
 atgaacctga accaatctgc ccacggtgac agggaacacg gattcattca cgcgaggatg 420
 agactcccaa gaaaggtcgt ggtgggacat tgggaagaca gagaagtcag ggaaaagatc 480
 gcaaaatgga tgagagtggc ctgctcgata caggatggaa gaactggaca gatcgtgaga 540
 ttcgctgata acatgagaga ggttgccagc accgaaggag acaagggtga ggcacagata 600
 aaactcggct ggtccataaa cacctggggt gtcggagagc tcgcccagag agtgaaggcg 660
 gttccagaaa acgaagtga ggaattgtt aaggagtaca aagaaaggta catcatgcc 720
 gaagacgaat acagcctcaa agcgatcaga gaacaggcga agatggagat tgcactgaga 780
 gagtctctga aagagaagaa tgccatcgcc ttcaccacca ccggtgagga tcttcacgat 840
 cttcccagc ttcccgtct tgcagtcagc aggtcatgg aggaagggtg tggatttga 900
 gcggaaggag actggaaggc agccgggctt gtgagggtt tgaaggatc gggagctggt 960
 cttcccgtg gtacatcctt catggaggac tacacctacc atctcacacc gggaaacgaa 1020
 ctcgtgctgg gagcgcacat gctagaggtg tgccccacga tcgctaagga aaagccaaga 1080
 atagaggtgc atcctctcag catcgggtga aaagcagatc ctgcacgcct tgttttcgat 1140
 ggacaagaag gtcccgtgt caacgcctcc atcgttgaca tgggaaacag gttcaggctg 1200
 gtagtgaaca gagtgttgc cgttcccatt gaaaggaaga tgcccaaact tccaacggca 1260
 agagttttgt ggaagccgct tcttgattc aagagggcga cgactgcgtg gattctcgt 1320
 ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactgg 1380
 gcggaggctt tggagataga gtatcctgtc atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc 1440
 aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tggggacttt taaaaagatg a 1491

<210>9
 <211> 1491
 <212> ADN
 <212> *Thermotoga neapolitana*

5

<400>9

ES 2 678 022 T3

atgatcgatc tcaaacagta tgagttctgg tttcttctcg gcagccagta tctctacggt 60
ctggagacgt tgaagaaggt agagcagcag gcaagcagga tagttgaggc actgaacaat 120
gatcccattt ttccctcaa gatcgttctg aaaccggtc tgaaaaattc cgccgagatc 180
agagagatct tcgaaaaggc aaatgcagaa ccaaaatgcg ccggtgtcat cgtgtggatg 240
cacacgttct caccttcgaa gatgtggata agaggcctct ccatcaataa aaaaccctg 300
cttcacctcc acaccagta caacaggag atcccgtggg acacgatcga tatggactac 360
atgaacctga accaatctgc ccacgggtgac agggaacacg gattcattca cgcgaggatg 420
agactcccaa gaaaggtcgt ggtgggacat tgggaagaca gagaagtcag ggaaaagatc 480
gcaaaatgga tgagagtggc ctgctcgata caggatggaa gaactggaca gatcgtgaga 540
ttcggcgata acatgagaga ggttgccagc accgaaggag acaaggtgga ggcacagata 600
aaactcggct ggtccataaa cacctggggt gtcggagagc tcgccgagag agtgaaggcg 660
gttccagaaa acgaagtgga ggaattgtg aaggagtaca aagaaaggta catcatgcca 720
gaagacgaat acagcctcaa agcgatcaga gaacaggcga agatggagat tgcactgaga 780
gagtttctga aagagaagaa tgccatcgcc ttcaccacca ccatggagga tcttcacgat 840
cttccccagc ttcccgtct tgcagtcagc aggctcatgg aggaagggtg tggatttggg 900
gcggaaggag actggaaggc agccgggctt gtgagggctt tgaaggatcat gggagctggt 960
cttcccgggtg gtacatcctt catggaggac tacacctacc atctcacacc gggaaacgaa 1020
ctcgtgctgg gagcgacat gctagaggtg tgccccacga tcgctaagga aaagccaaga 1080
atagagggtc atcctctcag catcgttggg aaagcagatc ctgcacgcct tgttttcgat 1140
ggacaagaag gtcccgtct caacgcctcc atcgttgaca tgggaaacag gttcaggctg 1200
gtagtgaaca gagtgttctc cgttcccatt gaaaggaaga tgcccaaact tccaacggca 1260
agagttttgt ggaagccgct tcttgatttc aagagggcga cgactgcgtg gattctcgtc 1320
ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactgg 1380
gcgaggcctt tgagataga gtatcctgtc atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc 1440
aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tggggacttt taaaagatg a 1491

<210> 10
<211> 1491
<212> ADN
<212> *Thermotoga neapolitana*

<400>10

atgatcgatc tcaaacagta tgagttctgg tttcttctcg gcagccagta tctctacggt 60

5

10

ES 2 678 022 T3

ctggagacgt tgaagaaggt agagcagcag gcaagcagga tagttgagggc actgaacaat 120
gatcccattt ttccctcaaa gatcgttctg aaacccttc tgaaaaattc cgccgagatc 180
agagagatct tcgaaaaggc aatgcagaa ccaaatgcg ccggtgtcat cgtgtggatg 240
cacacgttct caccttogaa gatgtggata agaggcctct ccatcaataa aaaaccctg 300
cttcacctcc acaccagta caacaggag atcccgtggg acacgatcga tatggactac 360
atgaacctga accaatctgc ccacgggtgac agggaacacg gattcattca cgcgaggatg 420
agactcccaa gaaaggtcgt ggtgggacat tgggaagaca gagaagtcag ggaaaagatc 480
gcaaaatgga tgagagtggc ctgctcgata caggatggaa gaactggaca gatcgtgaga 540
ttcggcgata acatgagaga ggttgccagc accgaaggag acaaggtgga ggcacagata 600
aaactcggct ggtccataaa cacctgggt gtcggagagc tcgccgagag agtgaaggcg 660
gttcagaaa acgaagtgga ggaattgtg aaggagtaca aagaaaggta catcatgcca 720
gaagacgaat acagcctcaa agcgcacaga gaacaggcga agatggagat tgcactgaga 780
gagtttctga aagagaagaa tgccatgcc ttcaccacca ccatcgagga tcttcacgat 840
cttccccagc ttcccgtct tgcagtcagc aggctcatgg aggaagggtg tggatttggg 900
gcggaaggag actggaaggc agccgggctt gtgagggctt tgaaggatcat gggagctggt 960
cttcccgggtg gtacatcctt catggaggac tacacctacc atctcacacc gggaaacgaa 1020
ctcgtgctgg gagcgcacat gctagagggtg tgccccacga tcgctaagga aaagccaaga 1080
atagaggtgc atcctctcag catcgggtgga aaagcagatc ctgcacgctt tgttttcgat 1140
ggacaagaag gtcccgtgt caacgcctcc atcgttgaca tgggaaacag gttcaggctg 1200
gtagtgaaca gagtgttgc cgttcccatt gaaaggaaga tgcccaaact tccaacggca 1260
agagttttgt ggaagccgct tcctgatttc aagagggcga cgactgctg gattctcgtc 1320
ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactgg 1380
gcgagggctt tggagataga gtatcctgtc atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc 1440
aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tggggacttt taaaaagatg a 1491

5 <210> 11
<211> 45
<212> ADN
<212> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador para sustituir el codón del aminoácido 275º con NNS (N: A, T, G o C, S: G o C)

<400>11
ccatcgctt caccaccacc nnsaggatc ttacgatct tcccc 45

15 <210> 12
<211> 45
<212> ADN
<212> Secuencia artificial

ES 2 678 022 T3

<220>

<223> cebador para sustituir el codón del aminoácido 275º con NNS (N: A, T, G o C, S: G o C)

<400>12

5 ggggaagatc gtgaagatcc tcsnnggtgg tgggaagggc gatgg 45

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

10 <212> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15

<400>13

ggatcccata ctcctttctc aacagag 27

<210> 14

<211> 30

20 <212> ADN

<212> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

25

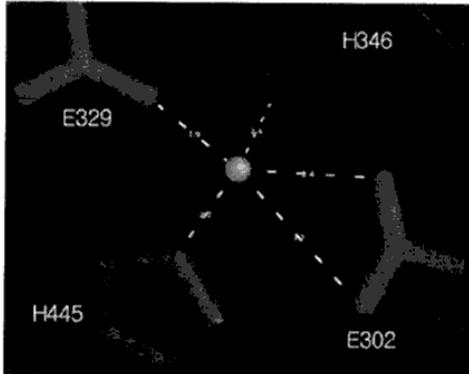
<400>14

cgctgttgag aaaggagtat gatgggatcc 30

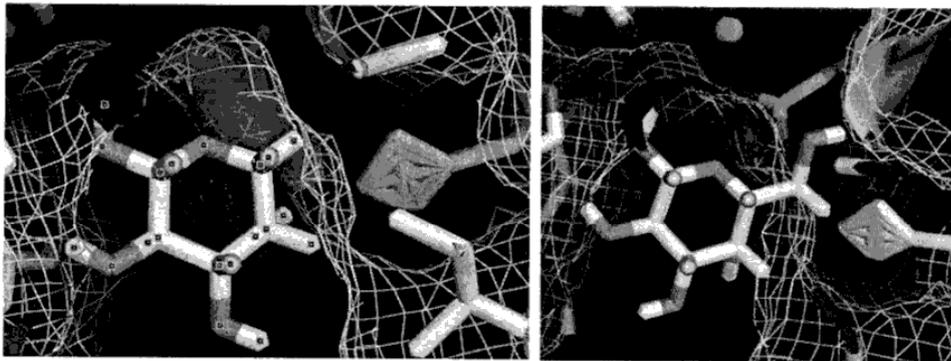
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de arabinosa isomerasa que tiene una actividad incrementada de conversión de D-galactosa en D-tagatosa, teniendo la variante de arabinosa isomerasa una sustitución de un aminoácido distinto de la fenilalanina para un aminoácido en la posición 275 y una sustitución de prolina para un aminoácido en la posición 469 de una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 10 2. La variante de arabinosa isomerasa de la reivindicación 1, en la que la sustitución del aminoácido para el aminoácido en la posición 275 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina, metionina e isoleucina.
- 15 3. La variante de arabinosa isomerasa de la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
4. Un polinucleótido que codifica la variante de arabinosa isomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. El polinucleótido de la reivindicación 4, el cual tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.
- 20 6. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4 o reivindicación 5.
7. Un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector recombinante de la reivindicación 6.
- 25 8. El microorganismo de la reivindicación 7, el cual es *Corynebacterium glutamicum*.
9. El microorganismo de la reivindicación 8, el cual es *Corynebacterium glutamicum* pFIS-1-TNAI-2 (KCCM 11378P), pFIS-1-TNAI-3 (KCCM 11379P) o pFIS-1-TNAI-4 (KCCM 11380P).
- 30 10. Un método para producir D-tagatosa, comprendiendo el método convertir D-galactosa en D-tagatosa usando la variante de arabinosa isomerasa según la reivindicación 1.
11. Un método para producir D-tagatosa, comprendiendo el método cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 35 12. El método de la reivindicación 10 o reivindicación 11, el cual comprende hacer reaccionar una solución que contiene D-galactosa con una fuente de ion metálico seleccionada del grupo que consiste en cloruro de manganeso, cloruro de magnesio y cloruro de zinc en presencia de la variante de arabinosa isomerasa.
- 40 13. El método de la reivindicación 12, en el que se añade el cloruro de manganeso a una concentración de 0,1 a 10 mM.

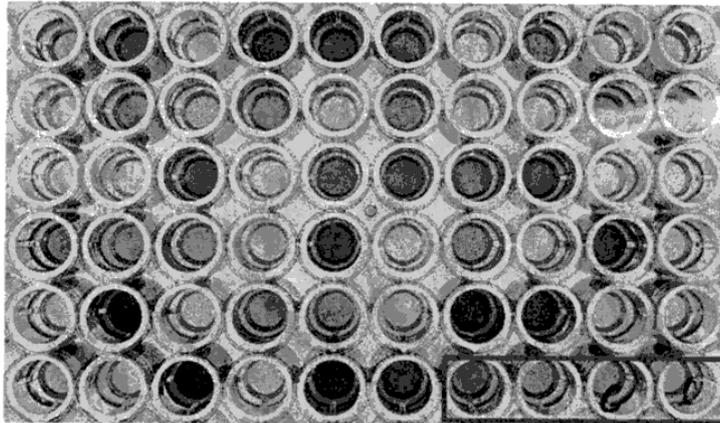
[Fig. 1]



[Fig. 2]

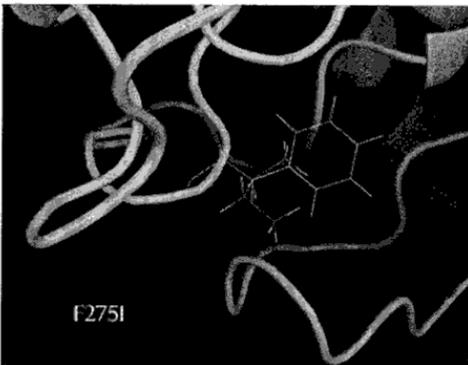
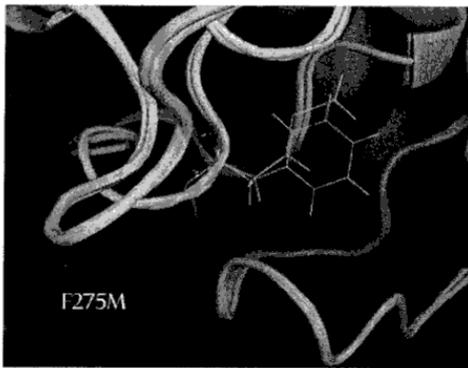
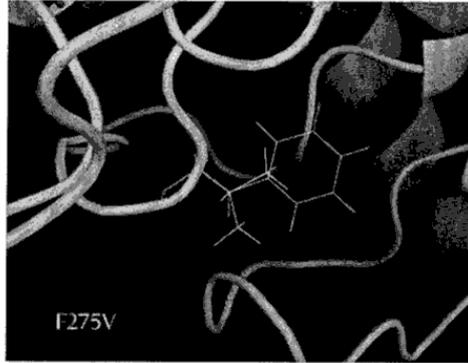


[Fig. 3]

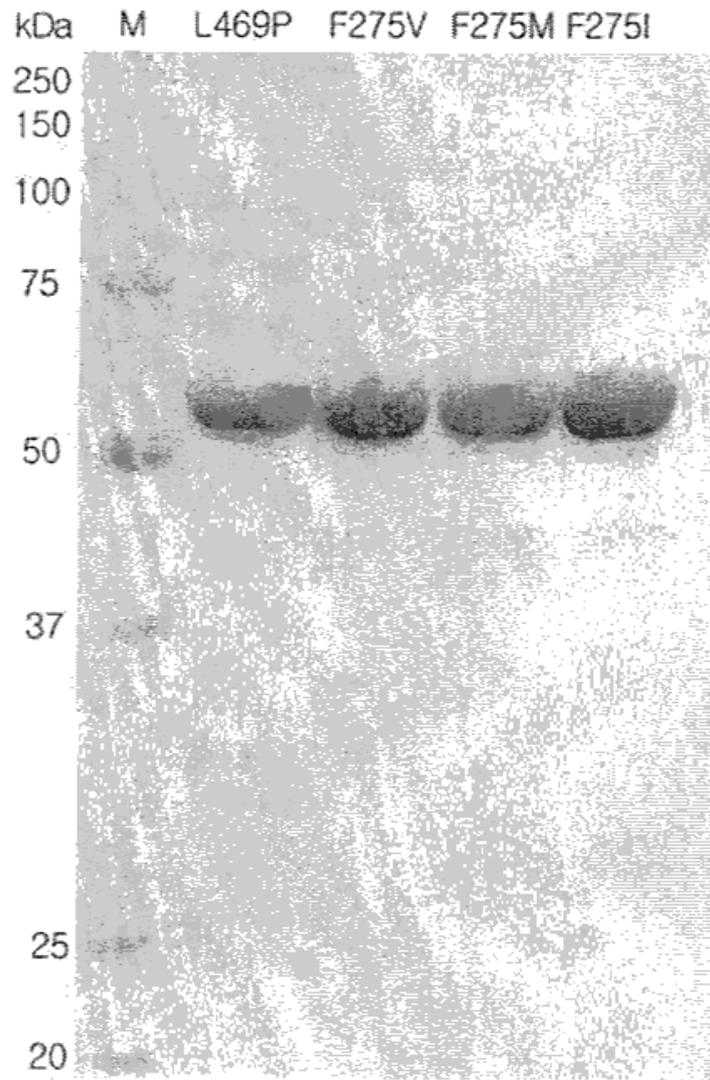


Control (L469P)

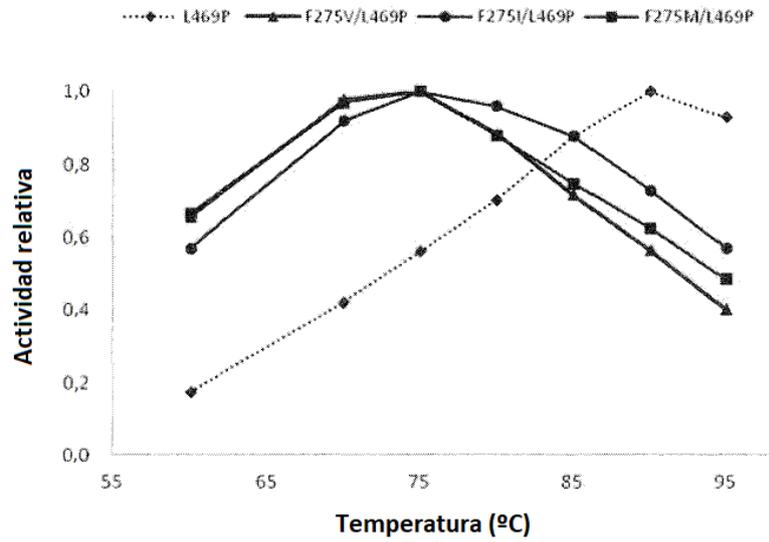
[Fig. 4]



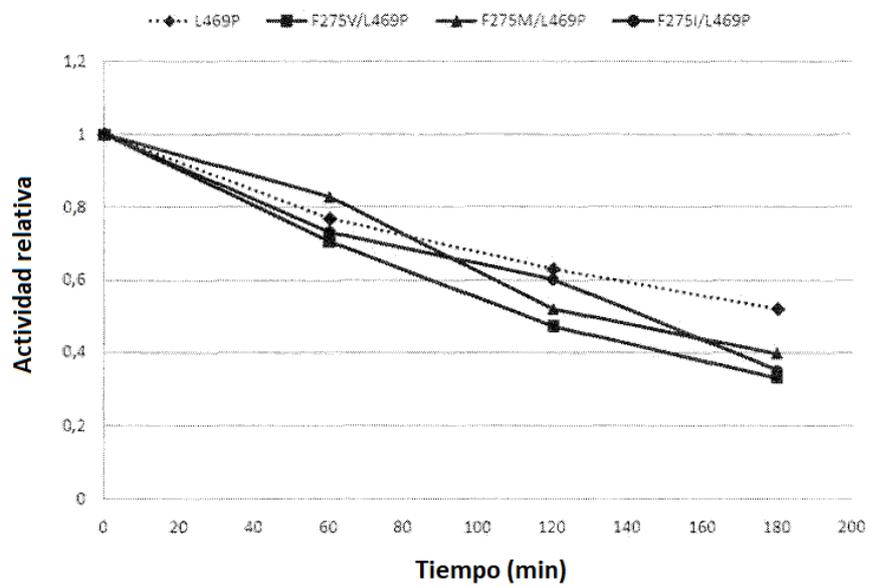
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

