

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 552**

51 Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2014 PCT/KR2014/003259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15099246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2014 E 14873792 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3088515**

54 Título: **Cepa de Ensifer sp. y método para producir psicosa que utiliza la misma**

30 Prioridad:

26.12.2013 KR 20130164686

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**SAMYANG CORPORATION (100.0%)
31, Jong-ro 33-gil, Jongno-gu
Seoul 03129, KR**

72 Inventor/es:

**AHN, SIN HYE;
KIM, HYE JUNG;
HAN, EUN JIN;
JEON, SE-HUI;
PARK, CHONG JIN y
LEE, KANG PYO**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 750 552 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

Cepa de *Ensifer sp.* y método para producir psicosa que utiliza la misma.

5 **[Campo técnico]**

La presente descripción se refiere a una nueva cepa de *Ensifer adhaerens* aislada del suelo, y a un método para producir psicosa que utiliza la misma.

10 **[Técnica anterior]**

La psicosa es un epímero C-3 de D-fructosa que es 70% tan dulce como D-fructosa, y de este modo encuentra aplicación como un ingrediente de azúcar de diversos alimentos funcionales para uso en el control de la glucemia, la prevención de caries dental, y la inhibición de la lipogénesis hepática.

15 Los alcoholes de azúcar, usados ampliamente como alternativas al azúcar, presentan el efecto secundario de provocar diarrea al ingerir una cierta cantidad o más, mientras que no se conocen efectos secundarios para la psicosa. Por tanto, la psicosa ha atraído un intenso interés para el uso de la misma como un edulcorante, pero puesto que la psicosa se encuentra raramente en la naturaleza, su producción eficaz es una premisa para la aplicación a la industria alimentaria.

20 Convencionalmente, la psicosa se produce químicamente a partir de D-fructosa a través de la catálisis de iones de ácido molíbdico. Mientras tanto, recientemente se ha conocido un método biológico que usa una psicosa epimerasa de *Agrobacterium tumefaciens* como uno de los enfoques más eficientes. Además, (World Journal of Microbiology and Biotechnology (2007), 23(4), 559-563), han descrito la producción de D-psicosa a partir de D-fructosa usando una cepa aislada de *Sinorhizobium sp.* De forma similar, la patente KR100832339 describe una cepa YB-58 de *Sinorhizobium* útil para convertir fructosa en psicosa. El método químico adolece de la desventaja de producir solamente una cantidad muy pequeña de psicosa durante el tratamiento de las melazas o la isomerización de la glucosa, el procedimiento es caro, y genera subproductos. Asimismo, el método biológico es desventajoso por cuanto la producción es de coste elevado y de bajo rendimiento.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de un método mediante el cual se pueda producir psicosa a una condición de temperatura y pH adecuada para la industrialización, con rendimientos elevados y sin generación de subproductos.

35 **[Descripción]**[Solución técnica]

40 Se aísla e identifica una nueva cepa de *Ensifer adhaerens* que presenta una actividad elevada convirtiendo D-fructosa en psicosa, se analiza la velocidad de conversión de psicosa a partir de fructosa usando la cepa, y se examinan las condiciones de reacción de pH, temperatura, y la dependencia del ion metálico para establecer la condición de producción optimizada para la producción en masa, y entonces se completa la presente invención.

45 Según la invención, se proporciona una cepa de *Ensifer adhaerens* SYG29 (depositada como un nº de registro de KCCM11405P) con actividad para producir psicosa.

50 En otra forma de realización de la invención, se proporciona un método para producir psicosa usando la cepa. En el método, se proporcionan las condiciones de reacción celular optimizadas para una elevada velocidad de conversión de psicosa, y las condiciones para la producción en masa de psicosa.

La presente invención se explicará con mayor detalle.

55 Se proporciona una nueva cepa de *Ensifer sp.* (*Ensifer adhaerens* SYG29 depositada como un nº de registro de KCCM11405P). La cepa de *Ensifer sp.* tiene una elevada actividad convirtiendo fructosa en psicosa. *Ensifer adhaerens* presenta ARNr 16s que presenta una secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1, tiene actividades de reducción de nitratos, actividad de ureasa, de beta-glucosidasa, y de beta-galactosidasa, y puede metabolizar los sustratos de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, D-maltosa y ácido málico. Además, la cepa de *Ensifer sp.* no tiene actividades de degradación de L-triptófano, fermentación de D-glucosa, de arginina dihidrolasa, de hidrólisis de gelatina, de utilización de gluconato potásico, de utilización de ácido cáprico, de utilización de ácido adípico, de utilización de citrato trisódico, y de utilización de ácido fenilacético.

60 La cepa de *Ensifer sp.* presenta una actividad elevada convirtiendo fructosa en psicosa. La capacidad de conversión en psicosa es debida a una enzima de la cepa que convierte fructosa en psicosa. La cepa en *Ensifer sp.* puede producir una enzima que presenta una actividad elevada convirtiendo fructosa en psicosa, o la enzima en una gran cantidad, proporcionando de ese modo la excelente productividad de psicosa. La cepa de *Ensifer sp.* se puede usar para la producción de psicosa e incrementar el rendimiento de producción.

En consecuencia, se proporciona una composición para producir psicosa que incluye por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula de la cepa de *Ensifer sp.*, en un cultivo celular y en un lisado celular. El cultivo celular incluye una enzima producida por la cepa de *Ensifer sp.*, y puede contener la célula de la cepa de *Ensifer sp.*, o es una disolución libre de células. El lisado celular significa lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.*, o el sobrenadante obtenido centrifugando el lisado celular, y de este modo incluye una enzima producida por la cepa de *Ensifer sp.* Excepto que se establezca de otro modo en la presente memoria, la cepa de *Ensifer sp.* o la célula de *Ensifer sp.* significa por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una masa celular de la cepa, un cultivo de la cepa, y un lisado de la cepa.

En otra forma de realización, se proporciona un método para producir psicosa usando la cepa de *Ensifer sp.* El método comprende la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa. En una forma de realización, la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa se lleva a cabo cultivando *Ensifer sp.* en el medio de cultivo que incluye fructosa. En otra forma de realización, la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa incluye, por ejemplo, una etapa de mezclar fructosa con la cepa de *Ensifer sp.* (para ejemplos, por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una célula, un cultivo celular, y un lisado celular de *Ensifer sp.*), o una etapa de poner en contacto la fructosa con un soporte inmovilizado con cepa de *Ensifer sp.* La reacción de la cepa de *Ensifer sp.* con fructosa puede convertir fructosa en psicosa, para obtener psicosa a partir de fructosa.

Para la producción eficaz de psicosa en el método, se usa D-fructosa, que sirve como sustrato, a una concentración de 40 a 75% (p/v) en la mezcla de reacción, por ejemplo a una concentración de 50 a 75% (p/v). La concentración menor que el límite inferior de la concentración de D-fructosa puede disminuir de esta manera la factibilidad económica de la psicosa. Por otro lado, si está presente a una concentración mayor que el límite superior, la D-fructosa es menos apta para disolverse. Por tanto, la concentración está comprendida preferentemente dentro del intervalo. La D-fructosa puede estar en forma de una disolución en un amortiguador o en agua (por ejemplo, agua destilada).

La reacción se puede llevar a cabo a un pH de 6 a 9.5, por ejemplo un pH de 7 a 9, a un pH de 7 a 8, o a un pH de 8 a 9. Además, la reacción se puede realizar a una temperatura de 30°C o mayor, por ejemplo a una temperatura de 40°C o mayor. Sin embargo, el sustrato D-fructosa puede ser capaz de sufrir oscurecimiento a 80°C o mayor. Por tanto, la reacción se puede realizar en la condición de temperatura de 40 a 80°C, por ejemplo de 50 a 75°C, de 60 a 75°C, o de 68 a 75°C. Además, un período más largo del tiempo de reacción conduce a una mayor velocidad de conversión de psicosa. Se recomienda realizar la reacción durante 1 h o más, por ejemplo 2 horas o más, 3 horas o más, 4 horas o más, 5 horas o más, o 6 h o más. Sin embargo, el tiempo de reacción se establece preferentemente dentro de 48 horas, puesto que, cuando el tiempo de reacción se prolonga alrededor de 48 horas, el incremento de la velocidad de conversión de la psicosa es escaso, o puede disminuir. Por tanto, el tiempo de reacción se puede establecer para oscilar de 1 a 48 horas, de 2 a 48 horas, de 3 a 48 horas, de 4 a 48 horas, de 5 a 48 horas, o de 6 a 48 horas. En consideración de los aspectos industrial y económico, el tiempo de reacción puede estar comprendido en el intervalo de 1 a 48 horas, 2 a 36 horas, 3 a 24 horas, 3 a 12 horas, o 3 a 6 horas, pero no está limitado a él. Esta condición se selecciona para maximizar el rendimiento de conversión de D-fructosa a psicosa.

Además, en el método para producir psicosa, su concentración se puede establecer para oscilar desde 5 mg (dcw: peso seco celular)/ml o mayor en toda la mezcla de reacción, por ejemplo puede oscilar de 5 a 100 mg(dcw)/ml, de 10 a 90 mg(dcw)/ml, de 20 a 80 mg(dcw)/ml, de 30 a 70 mg(dcw)/ml, de 40 a 60 mg(dcw)/ml, o de 45 a 55 mg(dcw)/ml. Si la concentración de masa celular está por debajo del límite inferior, se exhibe una actividad pobre o casi nula de conversión de la psicosa. Por otro lado, una concentración que excede el límite superior significa una multitud de células que probablemente actúen como un obstáculo a la optimización del rendimiento de conversión total de la psicosa.

La actividad de la enzima (por ejemplo, epimerasa) para convertir fructosa en psicosa se puede controlar mediante iones metálicos. Por tanto, la presencia de un ion metálico puede promover la reacción catalizada por la proteína enzimática, incrementando así el rendimiento de producción de la psicosa. El método para producir psicosa usando la cepa de *Ensifer sp.* incluye una etapa de añadir el ion metálico. En una forma de realización, el ion metálico se puede añadir al medio de cultivo durante el cultivo celular, o el cultivo se puede llevar a cabo en el medio de cultivo añadido mediante el ion metálico. En otra forma de realización, el ion metálico se puede añadir al sustrato que incluye fructosa, o una mezcla de fructosa y la cepa de *Ensifer sp.* En otra forma de realización, el ion metálico se puede añadir al soporte inmovilizado por la cepa de *Ensifer sp.*, una mezcla de fructosa y el soporte inmovilizado por la cepa de *Ensifer sp.* o una mezcla con fructosa.

El ion metálico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un ion de cobre, un ion de manganeso, un ion de calcio, un ion de magnesio, un ion de cinc, un ion de níquel, un ion de cobalto, un ion de hierro, y un ion de aluminio, y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el ion metálico puede ser un ion de manganeso, un ion de magnesio, un ion de níquel, un ion de cobalto, o una mezcla de los mismos, o puede ser un ion de manganeso, un ion de cobalto, o una mezcla de los mismos. Cuando la cantidad del ion metálico está por debajo de 0.5 mM, solamente existe un ligero efecto sobre la mejora en el rendimiento de producción de psicosa. De este

modo, el ion metálico se usa en una cantidad de 0.5 mM o mayor. Por otro lado, cuando la cantidad del ion metálico excede 5 mM, el efecto de la adición es insignificante en comparación con la cantidad sobrante. La cantidad del ion metálico se ajusta para que sea 5 mM o menos. Por ejemplo, el ion metálico se usa en una cantidad de 0.5 a 5 mM, por ejemplo 0.5 a 2 mM.

En tanto que establezca un entorno para mantener la actividad de la cepa o la proteína enzimática producida a partir de la cepa durante un período de tiempo prolongado, se puede usar cualquier soporte configurado para inmovilizar la cepa o la proteína enzimática a él. Por ejemplo, el alginato sódico puede servir como el soporte. El alginato sódico, un polisacárido coloidal de origen natural, encontrado abundantemente en las paredes celulares de algas marrones, consiste en ácido β -D-manurónico y ácido α -L-glurónico, con un enlace covalente β 1-4 entre ellos. Al permitir la inmovilización estable de la cepa o la enzima a él, el polímero lineal puede ser ventajoso para el rendimiento de producción de psicosa. En una forma de realización, para inmovilizar la cepa, se puede usar una disolución de alginato sódico 1.5 ~ 4.0% (p/v) (por ejemplo, disolución acuosa de alginato de sodio), por ejemplo una disolución de alginato sódico alrededor de 2.5% (p/v). A título de ejemplo, una masa celular de la cepa, un caldo de cultivo que contiene la enzima producida por la cepa, o un lisado de la cepa se mezcla con 1 a 2 volúmenes de una disolución acuosa de alginato de sodio, y la mezcla se hace gotear a una disolución de ion de calcio 0.2 M usando una bomba de jeringuilla y una bomba de vacío, para formar perlas a las que se inmoviliza la masa celular de la cepa, el cultivo que contiene la enzima producida por la cepa, o el lisado de la cepa. La enzima se puede purificar a partir de la cepa, a partir de un cultivo de la cepa o a partir de un lisado de la cepa, usando un método típico, por ejemplo diálisis, precipitación, adsorción, electroforesis, cromatografía de afinidad, o cromatografía de intercambio iónico.

En la producción de psicosa, se puede usar adicionalmente un tensioactivo no iónico, para incrementar la productividad de psicosa. El tensioactivo no iónico incrementa la permeabilidad a la membrana celular, y hace que se libere la enzima dentro de la célula, mejorando de ese modo la productividad de psicosa. El tensioactivo no iónico puede ser etoxilato de octilfenol (Triton X-100; $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$; n = 9 o 10) (véase la figura 8).

La composición para producir psicosa que incluye la cepa de *Ensifer sp.* incluye además el tensioactivo no iónico, tal como etoxilato de octilfenol. El método para producir psicosa incluye además una etapa de añadir el tensioactivo no iónico. En una forma de realización, el tensioactivo no iónico se puede añadir al medio de cultivo durante la etapa de cultivo celular, o el cultivo celular se puede llevar a cabo en el medio de cultivo añadido mediante el tensioactivo no iónico. En otra forma de realización, el tensioactivo no iónico se puede añadir a un sustrato reaccionante que incluya fructosa, o una mezcla de sustrato reaccionante y la cepa de *Ensifer sp.* En otra forma de realización, el tensioactivo no iónico se puede añadir al soporte inmovilizado por la cepa de *Ensifer sp.*, una mezcla de fructosa y el soporte inmovilizado por la cepa de *Ensifer sp.*, o una mezcla con fructosa.

La cantidad de tensioactivo no iónico añadido se puede determinar considerando el rendimiento de producción de psicosa, y puede ser 0.01 a 0.5% (v/v), por ejemplo 0.05 a 0.45% (v/v), 0.2 a 0.45% (v/v), o 0.3 a 0.42% (v/v).

El método para producir psicosa según la presente invención usa células para convertir fructosa en psicosa sin usar una disolución amortiguadora, produciendo de ese modo psicosa con un rendimiento elevado usando un procedimiento simple. Como se muestra en la figura 11, cuando la reacción se lleva a cabo a un intervalo de pH (por ejemplo, pH 7-9, pH 7-8 o pH 8-9) sin usar una disolución amortiguadora, la velocidad de conversión de psicosa se mantiene en un nivel elevado, en comparación con la reacción realizada fuera del intervalo de pH.

Tras ser producida a partir de D-fructosa usando el método de la presente invención, la psicosa se puede purificar mediante un método típico que se puede seleccionar fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo de entre el grupo que consiste en centrifugación, filtración, cristalización, cromatografía de intercambio iónico, y una combinación.

[Efectos ventajosos]

La nueva cepa de *Ensifer adhaerens* SYG29 de la presente invención tiene la actividad de producir psicosa, y es superior en estabilidad térmica en una condición aplicable industrialmente, y de este modo se puede esperar que tenga amplias aplicaciones útiles en diversos campos alimentario y farmacéutico funcionales.

[Descripción de los dibujos]

La figura 1 es una fotografía del análisis de TLC que representa la producción de fructosa a partir de psicosa usando la cepa de *Ensifer sp.* aislada, según una forma de realización de la presente invención (1: patrón de fructosa o psicosa, 2 a 3: la fructosa producida usando un sobrenadante obtenido a partir del lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.* aislada).

La figura 2 es un cromatograma de HPLC que representa la producción de psicosa a partir de una concentración elevada de fructosa.

La figura 3 es un resultado del análisis del árbol filogenético de la cepa en *Ensifer sp.* aislada según una forma de realización de la presente invención.

La figura 4 es una gráfica que representa la productividad de psicosa en la concentración celular.

La figura 5 es una gráfica que representa la productividad de psicosa sobre la temperatura de reacción.

La figura 6 es una gráfica que representa la productividad de psicosa sobre el pH de la reacción.

La figura 7 es una gráfica que representa la productividad de psicosa sobre los tipos de iones metálicos.

La figura 8 es una gráfica que representa la productividad de psicosa sobre la concentración de Triton X-100.

La figura 9 es una gráfica que representa la estabilidad térmica de la cepa de *Ensifer sp.* aislada sobre la temperatura.

La figura 10 es una gráfica que representa la productividad de psicosa realizada durante 6 horas sobre diversas temperaturas de reacción.

La figura 11 es una gráfica que representa la productividad de psicosa sobre la condición de pH inicial del sustrato de reacción, que se controla usando HCl y NaOH, sin usar una disolución amortiguadora.

[Modo para la invención]

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos proporcionados a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

Ejemplo 1: aislamiento de la bacteria del suelo con actividad para convertir D-fructosa en psicosa

Se usó el medio mínimo (KH_2PO_4 2.4 g/l, K_2HPO_4 5.6 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.6 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l, extracto de levadura 1 g/l) que contiene 1% de psicosa.

En 10 ml de 0.85% (p/v) de NaCl se suspendió 1 g de suelo de rizosfera, y 100 μl (microlitros) extraídos de la suspensión se extendieron sobre una placa de agar y se incubaron a 30°C. Entre las colonias formadas sobre las placas de agar, se realizó una selección de aquellas distintas en forma y tamaño. Las colonias seleccionadas se inocularon en un medio mínimo, y se cultivaron a 30°C durante 24 horas con agitación. La centrifugación recuperó una masa celular. Esta masa celular se suspendió en 100 μl de un amortiguador de PIPES (ácido piperazín-N,N'-bis(2-etanosulfónico)) 50 mM (pH 8.0), y se lisó usando un procesador ultrasónico (ColepParmer). Tras la centrifugación del lisado a 12,000 rpm y 4°C durante 10 min., el sobrenadante así formado se recuperó y se usó como una enzima bruta. Se trataron 10 mM de psicosa como un sustrato a 30°C durante 8 horas con la enzima bruta.

La conversión de psicosa a D-fructosa se monitorizó mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC). El análisis de TLC se llevó a cabo usando una fase sólida de gel de sílice 20 cm x 5 cm (Silica gel 60 F254 (Merck, Alemania), con un desarrollo con una mezcla 85:15 de acetonitrilo y agua como fase móvil, durante 3.5 min., dos veces. Para HPLC, se usó un detector del índice de refracción (Agilent 1260 RID) equipado con una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD). El agua sirvió como un disolvente móvil a un caudal de 0.6 ml/min. a 80°C.

En la figura 1 se representa el resultado del análisis de TLC.

Según el resultado del análisis de TLC, la cepa que presenta una actividad convirtiendo psicosa en fructosa se seleccionó, y entonces se inocularon en un medio mínimo que contiene 1% (p/v) de fructosa y 0.05% (p/v) de psicosa, y se cultivó a 30°C durante 24 horas. La masa celular se recuperó mediante centrifugación. La masa celular se lavó con NaCl 0.85% (p/v), y se suspendió a una concentración de 40 mg-dcw/ml en amortiguador de PIPES 50 mM (pH 8.0) que contiene 400 g/l de fructosa y 1 mM de iones de manganeso, y se hizo reaccionar con D-fructosa a 70°C durante 6 horas, seguido de la terminación de la reacción calentando la mezcla de reacción a 100°C durante 5 min. El análisis de HPLC confirmó la producción de psicosa. Para HPLC, se usó un detector del índice de refracción (Agilent 1260 RID) equipado con una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD) bajo la condición descrita anteriormente (disolvente: agua; temperatura: 80°C; caudal: 0.6 ml/min.). Los resultados se proporcionan en la figura 2. La selección final estaba formada por una cepa que se encontró que producía psicosa en la mayor cantidad, según se analizó mediante análisis de HPLC en la figura 2.

Ejemplo 2: identificación de bacteria con actividad para convertir D-fructosa en psicosa

Para identificar la cepa aislada en el ejemplo 1, se analizó la secuencia nucleotídica del ARNr 16s y las propiedades

ES 2 750 552 T3

bioquímicas. La secuencia nucleotídica de ARNr 16s se muestra en la SEC ID nº: 1 como se indica a continuación.

<Secuencia nucleotídica de ARNr 16s>

```

5' -> TGC AAG TCG AG C G C C C C G C A A G G G G A G C G G C A G A C G G G T G A G T A A C G C G T
G G G A A T C T A C C C T T T T C T A C G G A A T A A C G C A G G G A A A C T T G T G C T A A T A C
C G T A T A C G C C C T T C G G G G G A A A G A T T T A T C G G G A A A G G A T G A G C C C G C G T
T G G A T T A G C T A G T T G G T G G G G T A A A G G C C T A C C A A G G C G A C G A T C C A T A G
C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G C C A C A T T G G G A C T G A G A C A C G G C C C A A A C
T C C T A C G G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C A A T G G G C G C A A G C C T G A
T C C A G C C A T G C C G C G T G A G T G A T G A A G G C C C T A G G G T T G T A A A G C T C T T T
C A C C G G T G A A G A T A A T G A C G G T A A C C G G A G A A G A A G C C C C G G C T A A C T T C
G T G C C A G C A G C C G C G G T A A T A C G A A G G G G G C T A G C G T T G T T C G G A A T T A C
T G G G C G T A A A G C G C A C G T A G G C G G A C A T T T A A G T C A G G G G T G A A A T C C C G
G G G C T C A A C C C C G G A A C T G C C T T T G A T A C T G G G T G T C T A G A G T A T G G A A G
A G G T G A G T G G A A T T C C G A G T G T A G A G G T G A A A T T C G T A G A T A T T C G G A G G
A A C A C C A G T G G C G A A G G C G G C T C A C T G G T C C A T T A C T G A C G C T G A G G T G C
G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A
A A C G A T G A A T G T T A G C C G T C G G G C A G T T T A C T G T T C G G T G G C G C A G C T A A
C G C A T T A A A C A T T C C G C C T G G G G A G T A C G G T C G C A A G A T T A A A A C T C A A A
G G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A
G C A A C G C G C A G A A C C T T A C C A G C C C T T G A C A T C C C G A T C G C G G A T T A C G G
A G A C G T T T T C C T T C A G T T C G G C T G G A T C G G A G A C A G G T G C T G C A T G G C T G
T C G T C A G C T C G T G C G T G A G A T G T T G G G T T A A G T C C C G C A A C G A G C G C A A
C C C T C G C C C T T A G T T G C C A G C A T T T A G T T G G G C A C T C T A A G G G G A C T G C C
G G T G A T A A G C C G A G A G G A A G G T G G G G A T G A C G T C A A G T C C T C A T G G C C C T
T A C G G G C T G G G C T A C A C A C G T G C T A C A A T G G T G G T G A C A G T G G G C A G C G A
G A C C G C G A G G T C G A G C T A A T C T C A A A A G C C A T C T C A G T T C G G A T T G C A C
T C T G C A A C T C G A G T G C A T G A A G T T G G A A T C G C T A G T A A T C G C A G A T C A G C
A T G C T G C G G T G A A T A C G T T C C C G G G C C T T G T A C A C A C C G C C C G T C A C A C C
5
A T G G G A G T T G G T T C T A C C C G A A G G T A G T G C G C T A -> 3'

```

Como se representa en la figura 3, la cepa aislada mostró 100% de identidad de secuencia con *Ensifer adhanerens* como resultado del árbol filogenético de la cepa aislada, y se designó como *Ensifer adhanerens* SYG29. La cepa se depositó en el Korean Culture Center of Microorganism el 29 de marzo de 2013, y entonces se recibió como un número de registro de KCCM11405P.

En la siguiente tabla se resumen las propiedades bioquímicas de la cepa aislada.

[Tabla 1]

Clasificación	reacción
Reducción de nitratos	+
Degradación de L-triptófano	-
Fermentación de D-glucosa	-
Arginina dihidrolasa	-
Ureasa	+

Clasificación	reacción
β -glucosidasa	+
Hidrólisis de gelatina	-
β -galactosidasa	+
Utilización de D-glucosa	+
Utilización de L-arabinosa	+
Utilización de D-manosa	+
Utilización de D-manitol	+
Utilización de N-acetil glucosamina	+
Utilización de D-maltosa	+
Utilización de gluconato potásico	-
Utilización de ácido capríco	-
Utilización de ácido adípico	-
Utilización de ácido málico	+
Utilización de citrato trisódico	-
Utilización de ácido fenilacético	-

Ejemplo 3: determinación de la condición de producción óptima de psicosa usando la reacción celular

5 Para evaluar la velocidad de conversión de psicosa sobre los cambios en el pH y la temperatura, la cepa aislada se hizo reaccionar con el sustrato en diversas condiciones de pH y temperatura, para comparar la velocidad de conversión de psicosa.

3-1. El análisis de la actividad sobre la concentración celular

10 Para examinar la concentración celular mínima para producir psicosa, las cepas aisladas en el ejemplo 1 se incubaron durante 2 horas a 60°C a una concentración celular de 5 a 50 g(dcw)/l en amortiguador de PIPES 50 mM (pH 7.0) añadido con 500 g/l de fructosa y 1 mM de ion de Mn. La reacción se detuvo centrifugando a 13,000 rpm, y el sobrenadante se calentó durante 5 minutos. Después, el producto de reacción se analizó mediante el análisis de HPLC, para medir la psicosa producida. El análisis de HPLC se llevó a cabo mediante un detector del índice de refracción (Agilent 1260 RID) equipado con una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD) en la condición como se describe anteriormente (disolvente: agua; temperatura: 80°C; caudal: 0.6 ml/min.).

15 El resultado se representa en la figura 4. Como se representa en la figura 4, a medida que aumentó la concentración celular de la cepa, aumentó la cantidad de psicosa producida. Como resultado de la reacción celular, cuando la concentración celular fue 50 g(dcw)/l, la cantidad de psicosa producida fue 78.2 g/l como valor experimental máximo. Cuando la concentración celular fue 5 g(dcw)/l, se detectó la actividad de conversión de la cepa.

3-2. El análisis de la actividad sobre la temperatura de reacción

25 Para examinar la temperatura óptima sobre la producción de psicosa, la reacción celular se llevó a cabo en la misma condición del ejemplo 3-1, excepto que la cepa aislada en el ejemplo 1 se hizo reaccionar con el sustrato a una concentración celular de 20 mg(dcw)/ml a la temperatura de 40 a 70°C. Tras la reacción de 2 horas, la reacción se detuvo, y después se analizó mediante análisis de HPLC para medir la cantidad de psicosa producida según el mismo método del ejemplo 3-1.

30

3-3. El análisis de la actividad sobre el pH de la reacción

35 Para examinar la condición de pH óptimo sobre la producción de psicosa, la reacción celular se llevó a cabo en la misma condición del ejemplo 3-1, excepto que la cepa aislada en el ejemplo 1 se hizo reaccionar con el sustrato a una concentración celular de 25 mg(dcw)/ml en McIlvaine (disoluciones amortiguadoras con diversas cantidades de ácido cítrico 0.1M y disolución de hidrogenofosfato disódico 0.2M, para ajustar la condición de pH) de pH 6.0-8.0, y 100 mM de glicina pH 8.5 a 9.5 que se añadieron con 500 g/l de fructosa y 1 mM de ion de Mn a 70°C. Tras terminar la reacción, ésta se detuvo y después se analizó mediante análisis de HPLC para medir la cantidad de psicosa producida según el mismo método del ejemplo 3-1.

40

En la figura 6 se muestra el resultado del ensayo. Como se muestra en la figura 6, la actividad de conversión fue elevada a pH 7.0-9.0. En la condición de pH neutro de pH 7.0 a 8.0, la psicosa se pudo producir eficientemente.

3-4. El análisis de la actividad sobre el ion metálico

45

Para examinar la dependencia de los iones metálicos, la cepa aislada se hizo reaccionar con amortiguador de PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)) 50 mM (pH 7.0) añadido mediante 400 g/l de fructosa a 55°C en presencia de 1 mM de ion metálico de CuCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, NiSO₄, CoCl₂, o FeSO₄ disuelto en

PIPES. Tras terminar la reacción, ésta se detuvo, y después se analizó mediante análisis de HPLC para medir la cantidad de psicosa producida según el mismo método del ejemplo 3-1.

5 En la figura 7 se representa el resultado del ensayo. Como se representa en la figura 7, la actividad de conversión fue relativamente elevada, cuando se usaron el ion de Mn y el ion de Co, en comparación con la ausencia de ion metálico.

Ejemplo 4: condición para la producción en masa de psicosa

10 4-1. Productividad de psicosa sobre la concentración de Triton X-100

La adición de una concentración de Triton X-100 para incrementar la permeabilidad de la membrana celular puede hacer que se libere la enzima dentro de la membrana celular, acortando de ese modo el tiempo de producción de psicosa.

15 Para producir eficientemente psicosa usando la reacción celular, se analizó la productividad de psicosa cambiando la cantidad añadida de Triton X-100. La reacción se llevó a cabo a 60°C durante 2 horas, y se analizó con HPLC según el mismo método del ejemplo 3-1 (fructosa 500 g/l, 1 mM de ion de Mn), excepto que la cepa aislada se usó a una concentración celular de 20 mg(dcw)/ml, con adición de 0 a 0.5% (v/v) de Triton X-100. Tras la terminación de la reacción, la cantidad de psicosa producida se midió mediante análisis de HPLC.

20 En la figura 8 se representa el resultado del análisis de HPLC. Como se indica en la figura 8, la reacción añadida mediante Triton X-100 mostró una mayor producción de psicosa, en comparación con la falta de adición de Triton X-100 (concentración de Triton X-100: 0% (v/v)). Cuando la concentración de Triton X-100 fue 0.4% (v/v), la productividad más elevada de psicosa fue 48.9 g/l.

4-2. Estabilidad térmica de la célula

30 Para examinar la estabilidad térmica de la cepa aislada, la cepa obtenida en el ejemplo 1 se suspendió en disolución amortiguadora de PIPES 50 mM añadida mediante ion de Mn 1 mM, y se trató con choque térmico con calentamiento a 55°C o 60°C durante 22 horas. Después, la reacción se llevó a cabo a 400 g/l de la concentración final de fructosa y 20 mg(dcw)/ml de concentración celular a 55°C durante 1 hora adicional según el mismo método del ejemplo 3-1. La productividad de psicosa durante el tiempo de choque térmico se midió mediante análisis de HPLC.

35 En la figura 9 se representa el resultado del análisis de HPLC. Como se indica en la figura 9, cuando el choque térmico en las células se proporcionó a 55°C, se mantuvo alrededor de 52% de la actividad relativa tras 22 horas de choque térmico, en comparación con la ausencia de choque térmico. Cuando el choque térmico en la célula se proporcionó a 60°C, la actividad relativa disminuyó hasta alrededor de 10%. Como resultado, la semivida de la actividad celular fue 456 minutos (7.6 horas).

4-3. Productividad de psicosa

45 La productividad máxima de psicosa se evaluó en la condición establecida para la producción en masa de psicosa, cambiando el tiempo de reacción. La cepa aislada en el ejemplo 1 se hizo reaccionar con 40 mg-dcw/ml de concentración celular, 500 g/l de concentración de fructosa, y pH 7.0, a las temperaturas de 40, 50, o 70°C, según el método del ejemplo 3-1. El tiempo de reacción fue 6 horas, y la productividad de psicosa se analizó con HPLC en intervalos de 1 hora. La reacción se detuvo calentando a 100°C durante 5 minutos.

50 En la figura 10 se representa el análisis de HPLC. Como se representa en la figura 10, a medida que aumentó la temperatura de reacción y transcurrió el tiempo de reacción, aumentó la productividad de psicosa. Particularmente, cuando la reacción se llevó a cabo a 70°C después de 6 horas, la productividad máxima de psicosa alcanzada era 130.3 g/l de la cantidad de psicosa producida, que era alrededor de 26% de la velocidad de conversión.

55 4-4. Productividad de psicosa en la condición de pH inicial

60 Para evaluar la posibilidad de la producción en masa de psicosa en la condición de pH inicial, el sustrato se disolvió en agua destilada en lugar de en disolución amortiguadora, y el pH inicial se ajustó con HCl y NaOH. Haciendo referencia al método del ejemplo 3-1, la reacción se llevó a cabo a 70°C durante 7 horas a fructosa 400 g/l, 1 mM de ion de Mn, a una concentración celular de 40 mg(dcw)/ml, con adición de 0.4% (v/v) de Triton X-100, en las condiciones de pH inicial de 6.0, 6.5, o 7.0. Tras terminar la reacción, la cantidad de psicosa producida se midió mediante análisis de HPLC.

65 En la figura 11 se representa el resultado del análisis de HPLC. Como se indica en la figura 11, cuando la reacción se llevó a cabo usando la disolución de sustrato a pH inicial de 7.0, la cantidad de psicosa producida después de 6 horas de reacción fue 97.3 g/l en ausencia de disolución amortiguadora, que es 24.3% de la velocidad de

conversión.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[nº de registro]

Autoridad depositaria: Korean Culture Center of Microorganisms
 Nº de registro.: KCCM1 1405P
 Fecha de depósito: 29.03.2013

10

<110> SAMYANG GENEX CORPORATION

15

<120> Cepa del género *Ensifer* y método para producir psicosa utilizando la misma

<130> OPP20140763KR

<160> 1

20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1334

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNr 16S de KCCM11405P

<400> 1

tgcaagtcga ggcccccga aggggagcgg cagacgggtg agtaacgcgt gggaatctac	60
ccittttctac ggaataacgc agggaaactt gtgctaatac cgtatagcc cttcggggga	120
aagatttatac gggaaaggat gagcccgcgt tggattagct agttggtggg gtaaagcct	180
accaaggcga cgatccatag ctggtctgag aggatgatca gccacattgg gactgagaca	240
cggcccaaac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg gacaatgggc gcaagcctga	300
tccagccaag cgcgtgagtg gatgaaggcc ctagggttgt aaagctcttt caccggtgaa	360
gataatgacg gtaaccggag aagaagcccc ggctaacttc gtgccagcag ccgcgtaat	420
acgaaggggg ctagcgttgt tcggaattac tgggcgtaaa gcgcacgtag gcggacattt	480
aagtcagggg tgaatcccg gggctcaacc ccggaactgc ctttgatact ggggtgctag	540
agtatggaag aggtgagtgg aattccgagt gtagaggatga aattcgtaga tattcgagg	600
aacaccagtg gcgaaggcgg ctactggtc cactactgac gctgaggtgc gaaagcgtgg	660
ggagcaaaca ggattagata cccigttagt ccacgccgta aacgatgaat gttagccgtc	720
gggcagttta ctgttcggtg gcgcagctaa cgcatiaaac attccgcctg gggagtacgg	780
tcgcaagatt aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccga caagcgggtg agcatgtggt	840
ttaattcgaa gcaacgcga gaaccttacc agcccttgac atcccgatcg cggattacgg	900
agacgttttc cttcagttcg gctggatcgg agacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc	960

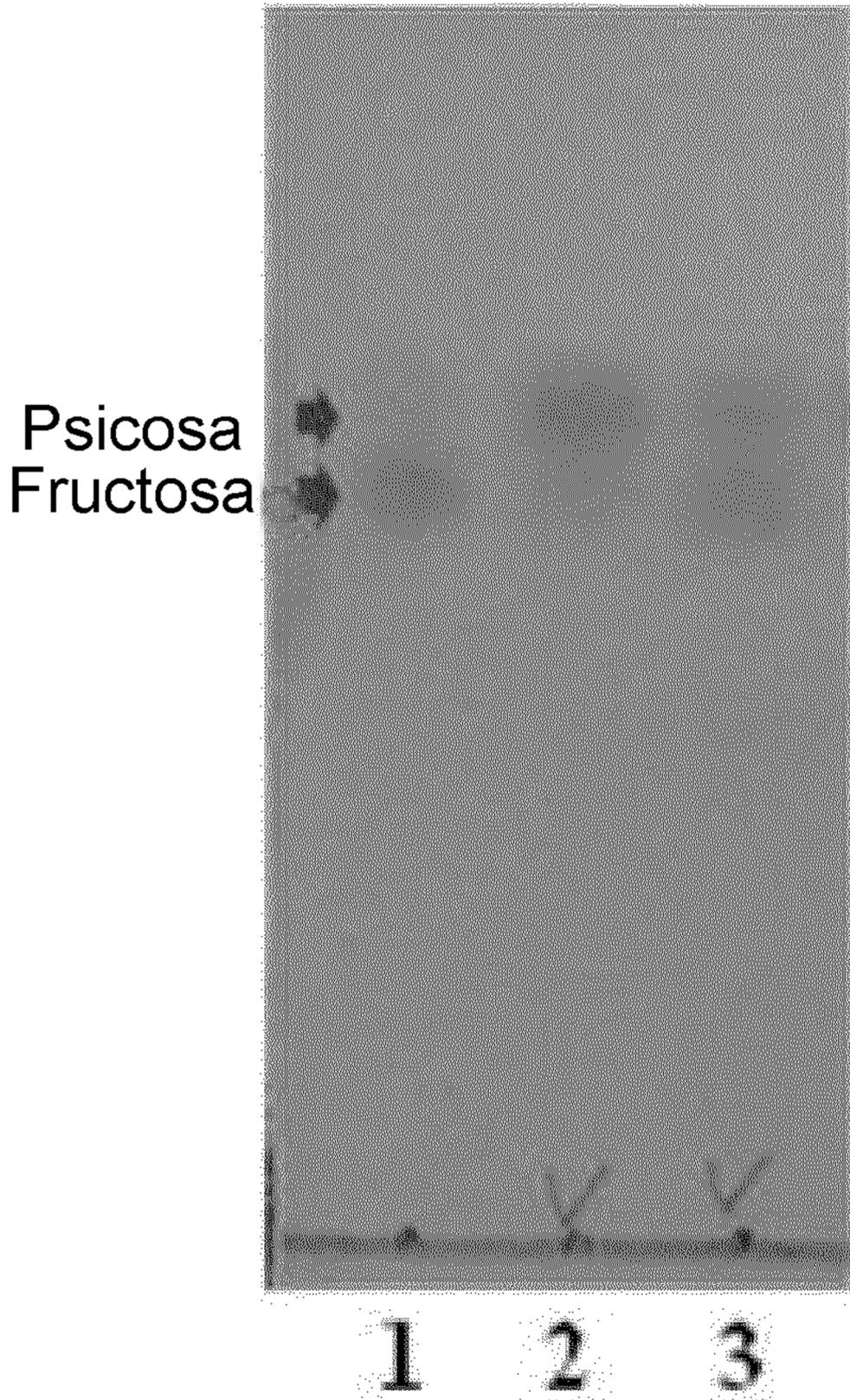
ES 2 750 552 T3

gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa ccctcgcct tagttgccag	1020
catttagttg ggcactctaa ggggactgcc ggtgataagc cgagaggaag gtggggatga	1080
cgtaagtcc tcatggcctt tacgggctgg gctacacacg tgctacaatg gtggtgacag	1140
tgggcagcga gaccgcgagg tcgagctaat ctccaaaagc catctcagtt cggattgcac	1200
tctgcaactc gagtgcata agttggaatc gctagtaatc gcagatcagc atgctgcggt	1260
gaatagttc ccgggccttg tacacacgcg ccgtcacacc atgggagttg gttctaccg	1320
aaggtagtgc gcta	1334

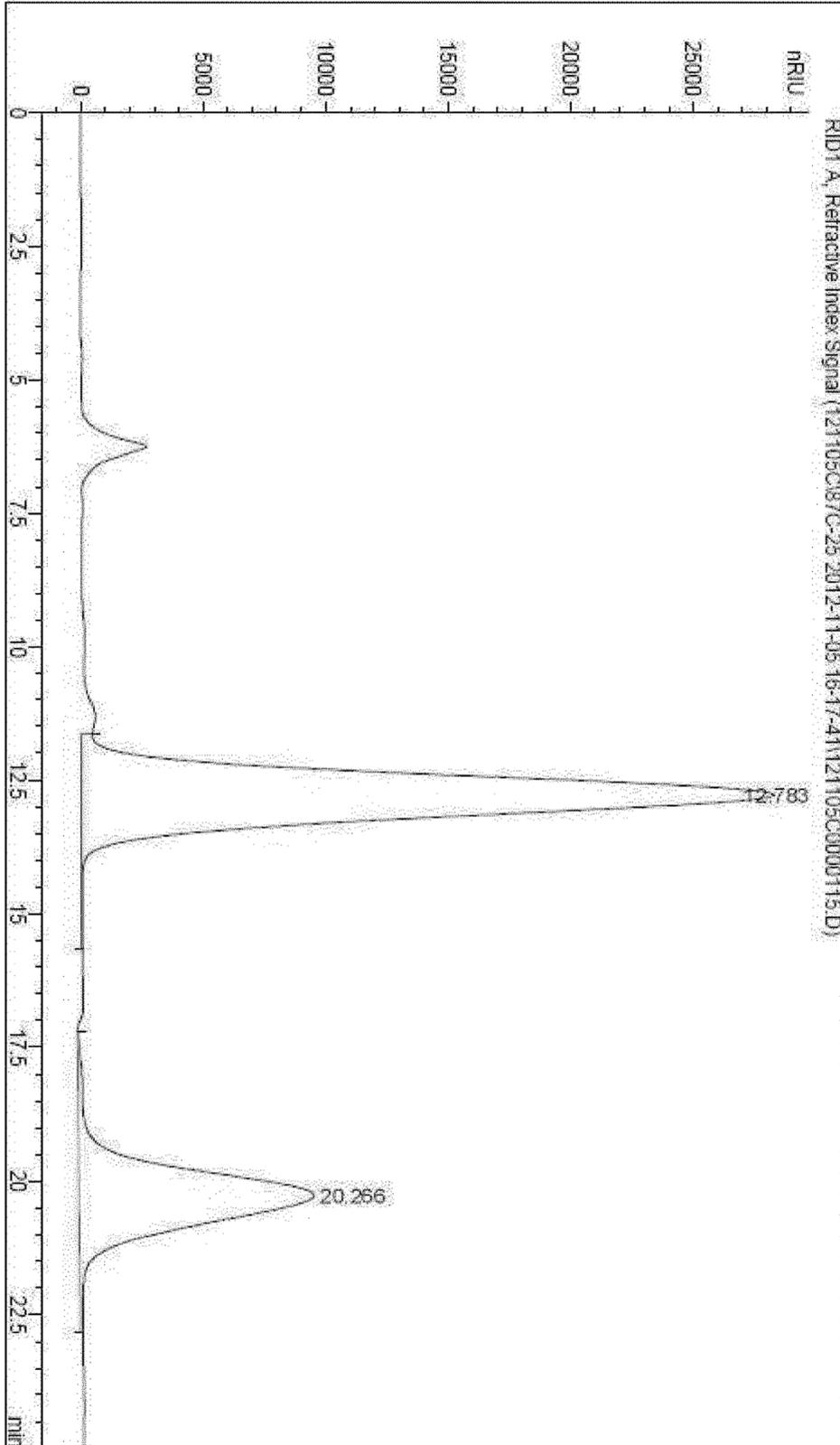
REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de psicosa a partir de fructosa utilizando la cepa de *Ensifer sp.*, que comprende una etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa, en el que la cepa de *Ensifer sp.* es *Ensifer adhaerens* SYG29 depositada como número de registro de KCCM11405P que presenta una actividad de convertir D-fructosa en D-psicosa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa se lleva a cabo a una temperatura de 60 a 75°C.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa de *Ensifer sp.* es por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula, un cultivo celular y un lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.*
- 20 4. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende una etapa de añadir un tensioactivo no iónico.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de hacer reaccionar la cepa de *Ensifer sp.* con fructosa se lleva a cabo cultivando la cepa de *Ensifer sp.* en el medio de cultivo que contiene fructosa.
- 30 6. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa comprende una etapa de mezclar la fructosa con por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en célula, cultivo celular y lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.*
- 35 7. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de hacer reaccionar *Ensifer sp.* con fructosa comprende una etapa de poner en contacto la fructosa con un soporte inmovilizado con por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en célula, cultivo celular y lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.*
- 40 8. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además una etapa de añadir por lo menos un ion metálico seleccionado de entre el grupo que consiste en iones de Mn, Mg, Ni, Co, Fe y Al.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el método se lleva a cabo sin utilizar una disolución amortiguadora.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fructosa se utiliza a una concentración de 40 a 75% (p/p).
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el método se lleva a cabo a un pH de 6 a 9.
12. Composición para producir psicosa a partir de fructosa, que comprende la cepa de *Ensifer sp* que es *Ensifer adhaerens* SYG29 depositada como número de registro de KCCM11405P y presenta una actividad de convertir D-fructosa en D-psicosa.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que la cepa de *Ensifer sp.* es por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en célula, cultivo celular y lisado celular de la cepa de *Ensifer sp.*
14. Cepa de *Ensifer adhaerens* que presenta una actividad de convertir fructosa en psicosa y es la *Ensifer adhaerens* SYG29 depositada como número de registro de KCCM11405P.

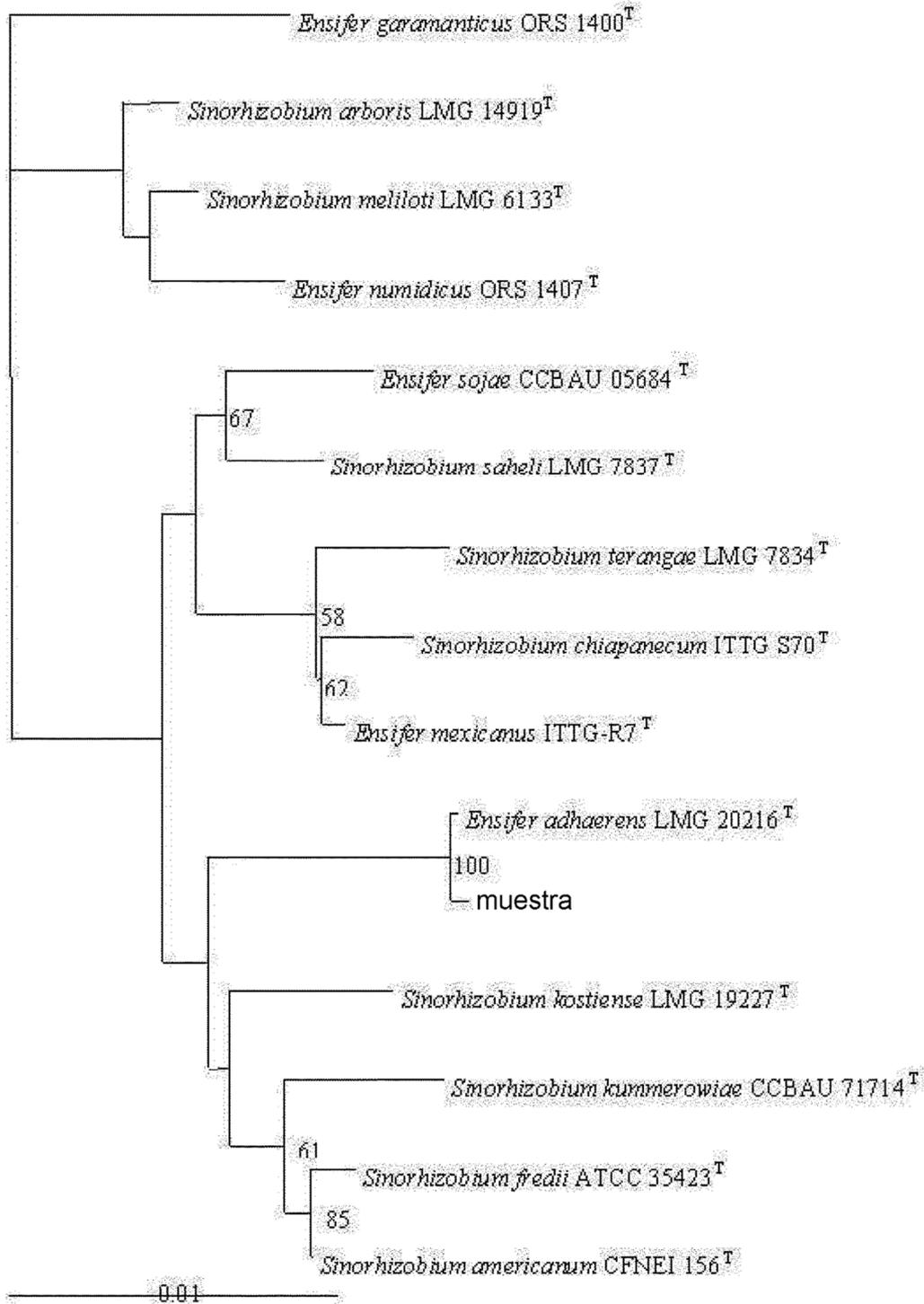
【FIG. 1】



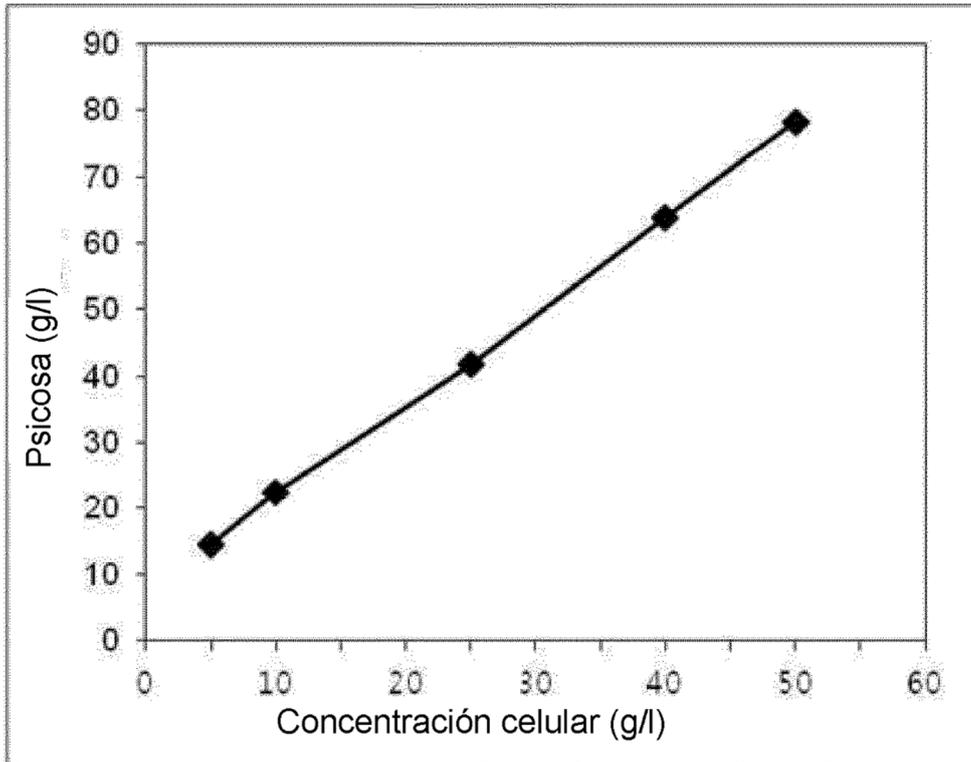
【FIG. 2】



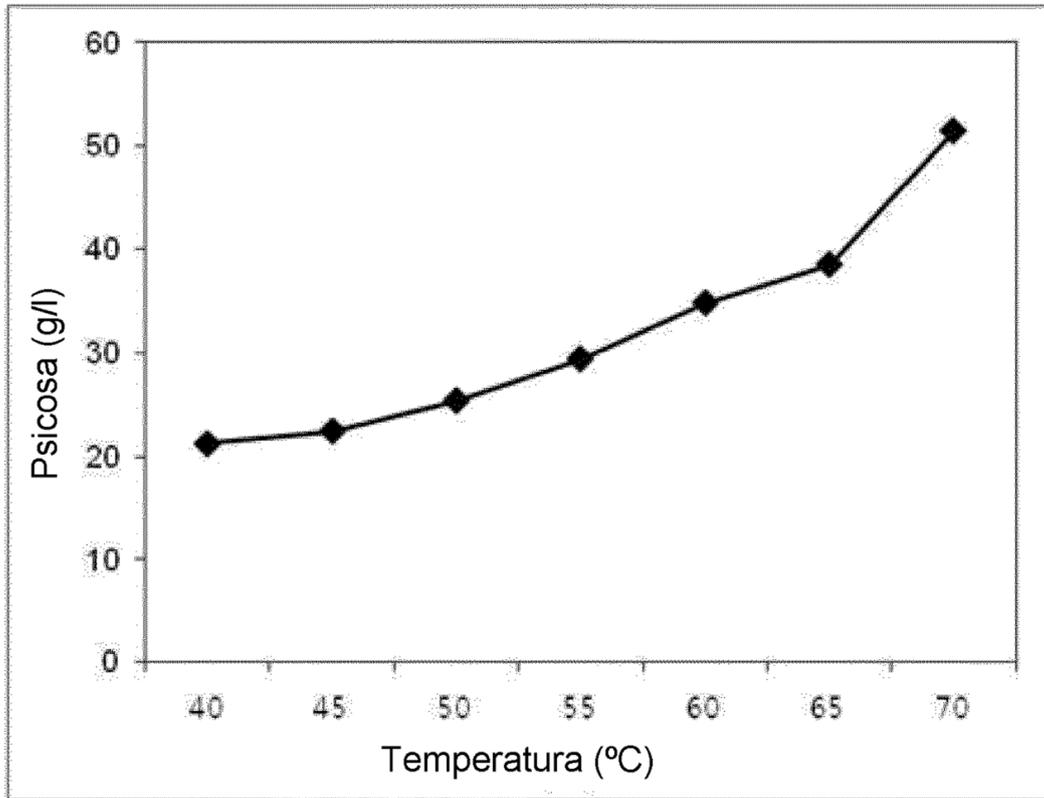
【FIG. 3】



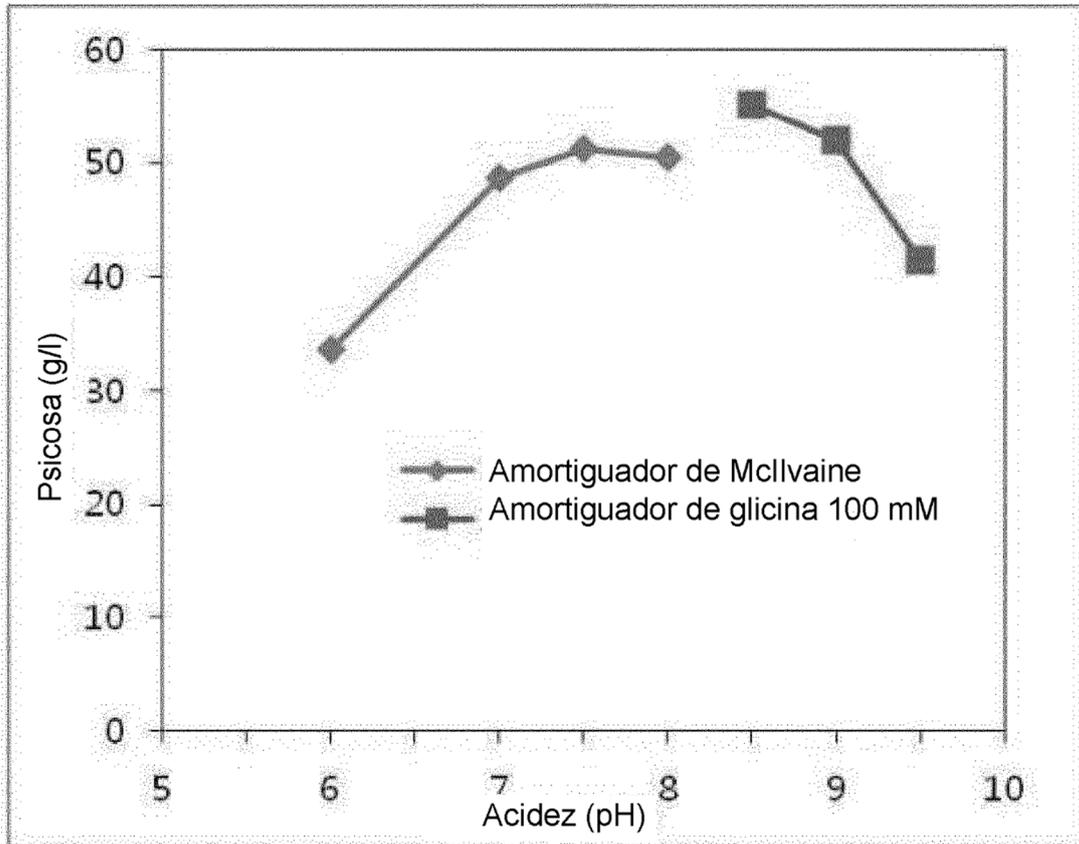
【FIG. 4】



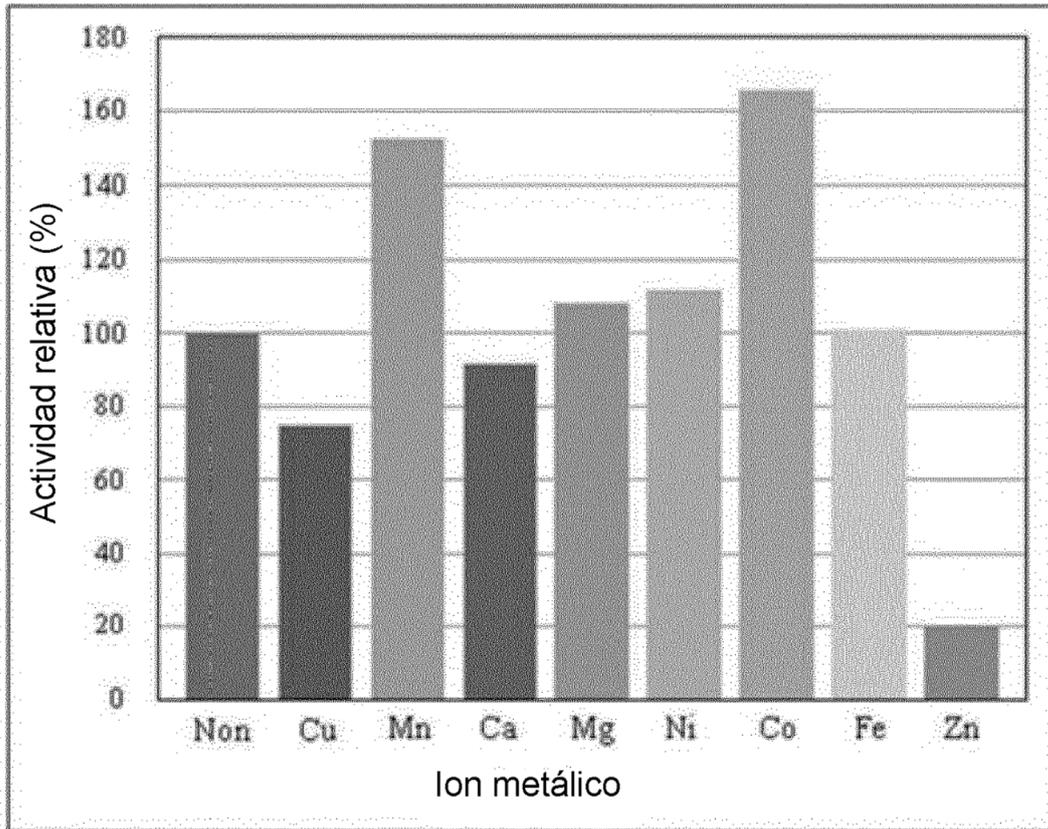
【FIG. 5】



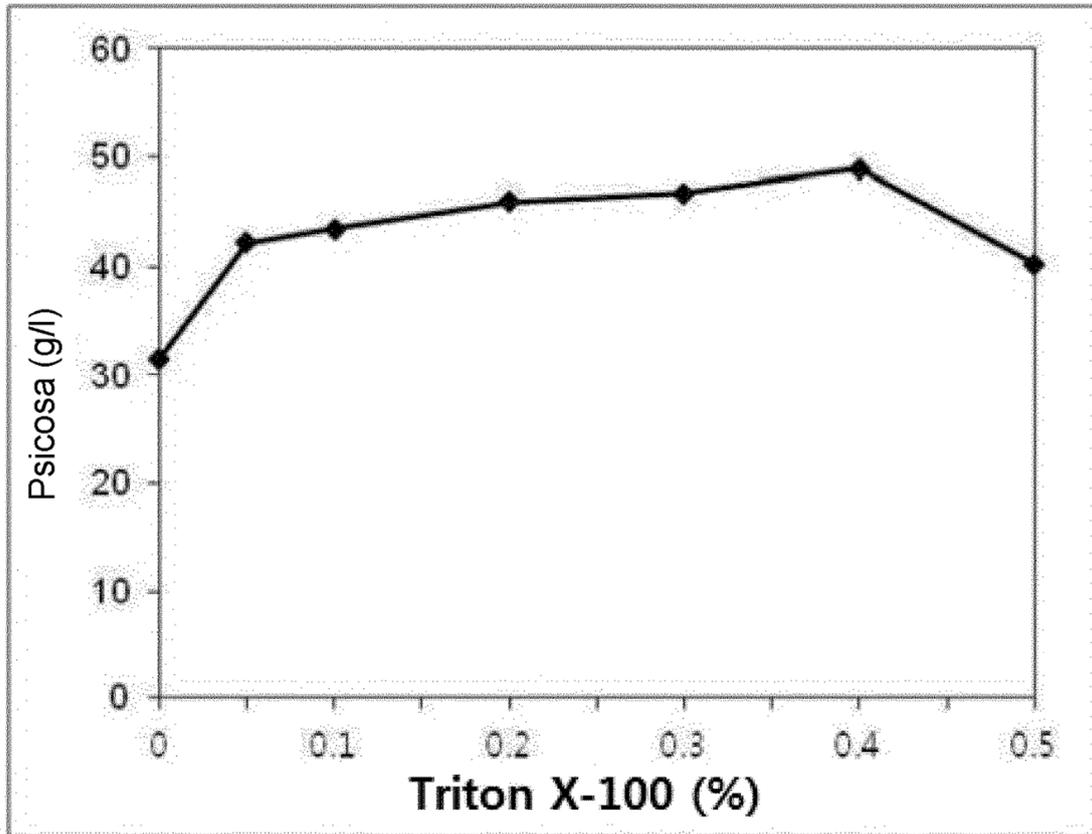
【FIG. 6】



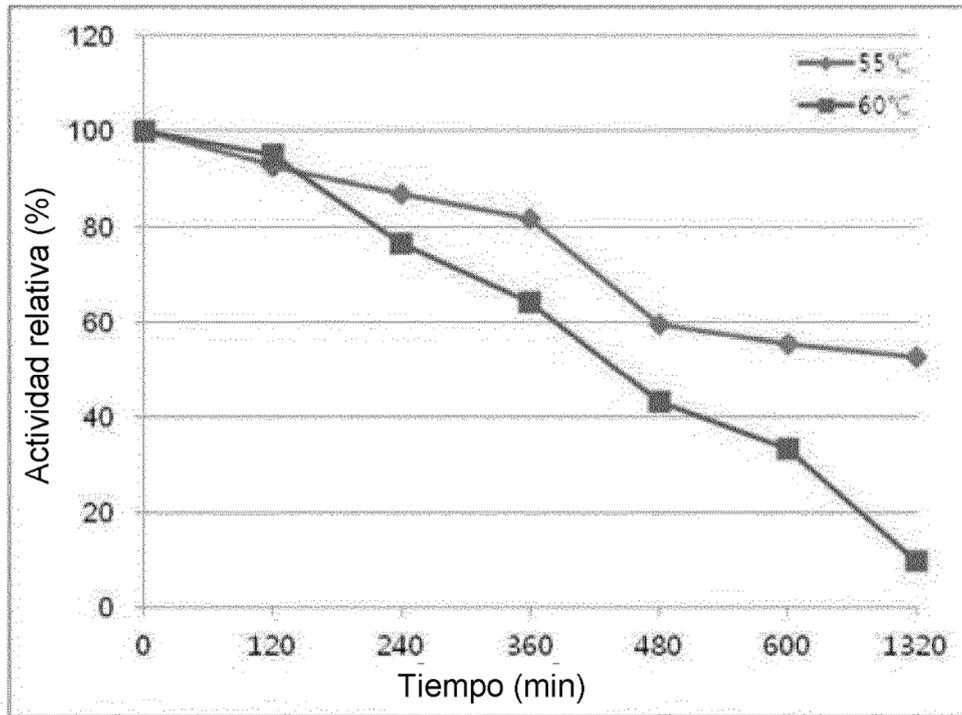
【FIG. 7】



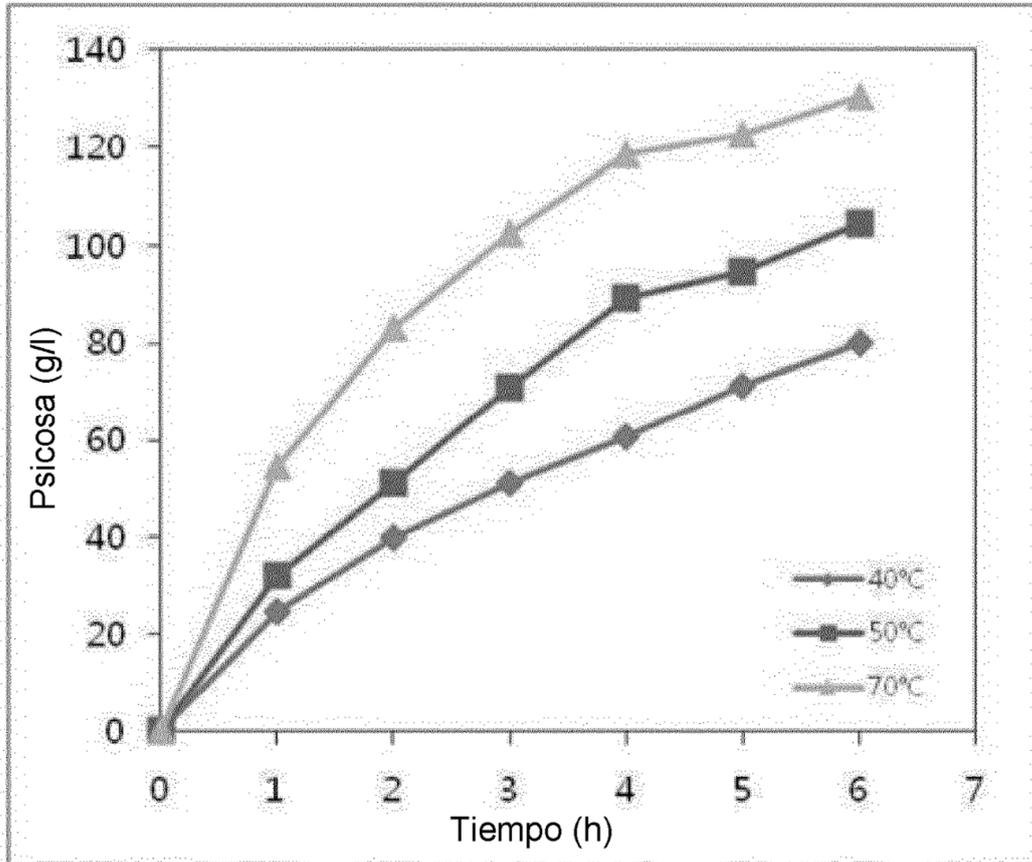
【FIG. 8】



【FIG. 9】



【FIG. 10】



【FIG. 11】

