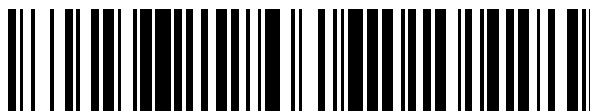


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 749**

51 Int. Cl.:

C12N 15/77 (2006.01)
C12N 15/61 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2015** **PCT/KR2015/011595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016** **WO16068656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2015** **E 15853745 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 3214176**

54 Título: **Sistema de expresión de psicosa epimerasa y producción de psicosa que utiliza la misma**

30 Prioridad:

30.10.2014 KR 20140149019
22.05.2015 KR 20150072090

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HEO, JIN SOL;
KIM, HYE JUNG;
KIM, MIN JEONG;
CHOI, JEONG YOON;
PARK, CHONG JIN y
LEE, KANG PYO

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 796 749 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

Sistema de expresión de psicosa epimerasa y producción de psicosa que utiliza la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un sistema de expresión que es capaz de producir psicosa epimerasa que presenta una velocidad de conversión y estabilidad elevadas; que se reconoce generalmente como microorganismo seguro (GRAS) que incluye el sistema de expresión, y un método de producción de psicosa mediante la utilización del microorganismo y el enzima.

Antecedentes de la técnica

Se producen diversos compuestos biosintéticos en el proceso metabólico natural y se utilizan en diferentes campos industriales, tales como el alimentario, de alimentación animal, el cosmético y el farmacéutico. Los compuestos se producen mediante la utilización de una bacteria u otro microorganismo desarrollado para producirlos y secretarlos a gran escala. Por ejemplo, se han utilizado especies de *Corynebacterium* en la industria de la producción de aminoácidos. A mediados de los 1950, se utilizó *Corynebacterium glutamicum* para producir ácido glutámico eficientemente y un mutante auxotrófico de *Corynebacterium glutamicum* para producir diversos aminoácidos mediante la utilización de la fermentación.

La expresión de diversos genes relacionados puede regularse con precisión para la ingeniería celular, requiriendo por lo tanto un sistema de expresión eficiente. Se conocen en la técnica diferentes componentes de una secuencia reguladora celular. Son ejemplos de los componentes, una región de unión al operador, una región de unión a ARN polimerasa de las regiones -35 y -10, y un sitio de unión de ribosoma o secuencia de Shine-Dalgarno en el ARN 16S ribosómico.

La selección del promotor para el desarrollo del sistema de expresión es importante, ya que el promotor participa en gran medida en el nivel de expresión génica y la regulación de la expresión. Se ha informado de varios promotores aplicables a *Corynebacterium glutamicum* y derivan de *Corynebacterium* sp. o de *E. coli* (J. Biotechnol., 104:311-323, 2003).

Sin embargo, el promotor derivado de *E. coli* presenta una baja permeabilidad como inductor de la expresión y la ausencia de inhibidor de la expresión génica, por lo que muestra una actividad baja respecto a la de *Corynebacterium*. Aunque se utilicen los mismos promotores, sus actividades serán diferentes según la secuencia de recubrimiento del gen diana. Los promotores utilizados en *Corynebacterium* resultan difíciles de preparar para el objetivo deseado, debido al estrecho intervalo de niveles de expresión de los promotores. Especialmente, al regular conjuntamente las expresiones de diversos genes, tal como en el establecimiento de una ruta metabólica, no pueden seleccionarse diversos promotores de *Corynebacterium*, al contrario que en *E. coli*.

La psicosa está centrando la atención como edulcorante dietético, aunque se requiere su producción a gran escala para la aplicación a alimentos debido a que es un azúcar raro en la naturaleza. En la técnica anterior, la psicosa se ha producido en gran medida mediante un método de síntesis química. Como método enzimático, el documento nº KR10-0744479 da a conocer la producción en masa de psicosa mediante la utilización de la psicosa epimerasa producida por *E. coli* transformado con el gen codificante de la psicosa epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens*. Existe un método para producir psicosa mediante la utilización de un microorganismo productor de enzima sin purificación a un coste de producción bajo. En la exposición nº KR10-1106253, *E. coli* recombinante transformado con el gen codificante de psicosa-3-epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* y que incluye un gen específico inactivado, se inocula en un medio de cultivo que incluye fructosa a fin de convertir la fructosa en psicosa.

El *E. coli* recombinante utilizado en el documento nº KR10-1106253 no es un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) y, de esta manera, no puede resultar adecuado para la industria alimentaria. Además, la psicosa epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* presenta una baja actividad enzimática y una baja estabilidad térmica.

El documento nº KR14-0021974 da a conocer un casete de expresión génica, productor de una psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp., y que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa, y una secuencia reguladora que está operablemente conectada con la secuencia de nucleótidos en dirección 5' y que regula la expresión de la secuencia de nucleótidos en *Corynebacterium* sp., en el que la secuencia reguladora comprende un promotor (por ejemplo, un promotor Trc).

Sigue existiendo una necesidad de desarrollar un sistema de expresión capaz de producir la psicosa epimerasa con una actividad enzimática elevada en un microorganismo GRAS con un alto rendimiento y en un sistema de expresión estable, un método de producción de psicosa epimerasa que utiliza el sistema de expresión y un método de producción de psicosa mediante la utilización del enzima o microorganismo GRAS transformado.

Divulgación

Problema técnico

Una forma de realización proporciona un casete de expresión que incluye una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa y una secuencia reguladora que está operablemente conectada con la secuencia de nucleótidos en dirección 5' y que regula la expresión de la secuencia de nucleótidos en *Corynebacterium* sp., en el que la secuencia reguladora comprende un promotor, incluyendo una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, una secuencia de primer sitio de unión de ribosoma (RBS) que incluye una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 2, y un primer espaciador que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 4 a SEC ID nº 6.

Otra forma de realización proporciona un vector que se utiliza en *Corynebacterium* sp., que incluye el casete de expresión génica.

Una forma de realización adicional proporciona una célula *Corynebacterium* sp. que expresa la psicosa epimerasa, incluyendo el casete de expresión génica o transformada con el vector que comprende el casete de expresión génica.

Una forma de realización todavía adicional proporciona la utilización de una composición para la producción de una psicosa epimerasa y/o psicosa, que comprende por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en células de *Corynebacterium* sp. recombinantes, un cultivo celular de *Corynebacterium* sp. recombinante, un lisado de células *Corynebacterium* sp. recombinantes y un extracto de dicho cultivo celular o dicho lisado celular.

Todavía otra forma de realización proporciona un método de producción de psicosa, utilizando por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en psicosa epimerasa, una célula recombinante, un cultivo de células recombinantes, un lisado de las células recombinantes y un extracto de cultivo o el lisado celular.

Solución técnica

La presente invención se refiere a un casete de expresión génica capaz de producir psicosa con un alto rendimiento con alta estabilidad, un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro), a un método para producir el enzima mediante la utilización del microorganismo GRAS y a un método para producir la psicosa mediante la utilización del microorganismo GRAS y el enzima.

El promotor derivado de *E. coli* muestra una actividad baja en *Corynebacterium* sp., debido a que el factor inductor de expresión presenta una baja permeabilidad y el material de expresión génica no existe en *Corynebacterium* sp. Por lo tanto, se proporciona un promotor adecuado para expresar una psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp.

Se proporciona un promotor capaz de producir psicosa con un alto rendimiento con alta estabilidad, una secuencia reguladora que incluye el promotor y un casete de expresión génica que incluye la secuencia reguladora, produciendo de esta manera psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp. con un alto rendimiento con elevada estabilidad y en gran cantidad. Además, se proporciona una psicosa epimerasa que puede expresarse a una tasa elevada en combinación con el promotor y una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa.

En la presente memoria, el término "promotor", la expresión "molécula de nucleótidos con una actividad de promotor" o "secuencia de promotor" se refiere a una molécula de nucleótidos capaz de regular la transcripción o la expresión de un nucleótido de interés, que está operablemente conectada con el nucleótido de interés. El promotor puede incluir un promotor de transcripción y un promotor de expresión.

La secuencia de nucleótidos de interés puede unirse al promotor químicamente y puede unirse al promotor mediante la utilización de una secuencia reguladora génica adicional y/o una secuencia de nucleótidos conectora, y similares. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de interés que debe transcribirse puede localizarse en dirección 3' del promotor (es decir, el extremo 3' de la secuencia del promotor). El intervalo entre la secuencia de promotor y la secuencia de nucleótidos que debe transcribirse puede presentar preferentemente 200 pares de bases o menos, o más preferentemente, de 100 pb o menos.

En la presente memoria, la expresión "sitio de unión de ribosoma" (RBS) o "secuencia de Shine-Dalgarno" se refiere a una región de secuencia polinucleótida rica en A/G a la que se une un ribosoma para la traducción.

En la presente memoria, la expresión "secuencia reguladora" se refiere a una molécula de nucleótidos con una actividad reguladora de la expresión génica, tal como la transcripción y/o la traducción del polinucleótido diana y que está operablemente ligada al polinucleótido diana. La secuencia reguladora puede denominarse "secuencia de nucleótidos reguladora".

A continuación en la presente memoria, la expresión “casete de expresión” incluye una secuencia reguladora que está operablemente ligada a la secuencia de nucleótidos diana, tal como una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa. Por lo tanto, el casete de expresión puede incluir una secuencia de nucleótidos requerida para expresar una proteína después de la transcripción o la traducción, así como una secuencia de nucleótidos reguladora de la transcripción o la traducción.

En la presente invención, la molécula de nucleótidos es preferentemente una molécula no natural, una molécula aislada o un tipo sintético o recombinante. El término “aislado” referido a una molécula de nucleótidos puede no incluir otra molécula de nucleótidos en la fuente natural, otro material celular o cualquier componente del medio de cultivo en el caso del método de producción recombinante, u otro precursor químico u otros productos químicos en el caso del método de síntesis química.

En una forma de realización, la secuencia reguladora utilizada para *Corynebacterium* sp. puede expresar la psicosa epimerasa con una elevada estabilidad y actividad enzimática en un microorganismo GRAS con elevado rendimiento y estabilidad.

La presente invención se describe en detalle a continuación en la presente memoria.

Una forma de realización de la presente invención proporciona un casete de expresión génica, productor de una psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp. y que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa, y una secuencia reguladora operablemente conectada con la secuencia de nucleótidos en dirección 5' y reguladora de la expresión de la secuencia de nucleótidos en *Corynebacterium* sp., en la que la secuencia reguladora comprende un promotor que incluye una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, una secuencia de primer sitio de unión de ribosoma (RBS) que incluye una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 2, y un primer espaciador que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 4 a SEC ID nº 6 (promotor-RBS1-espaciador1).

La secuencia reguladora se opera en *Corynebacterium* sp. y, de esta manera, una psicosa epimerasa con elevadas estabilidad y actividad puede expresarse en un microorganismo GRAS. La secuencia reguladora incluye una secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa, y un promotor que expresa la psicosa epimerasa en un microorganismo GRAS, por ejemplo *Corynebacterium* sp. o una secuencia reguladora que incluye el promotor. La secuencia reguladora puede ser una secuencia de nucleótidos no modificada o modificada que regula la expresión de la secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp.

Se muestran ejemplos de promotores en la secuencia reguladora en la tabla 1 (cabe destacar que únicamente la SEC ID nº 1 forma parte de la presente invención).

[Tabla 1]

SEC ID nº	Secuencia de nucleótidos (5' -> 3')	nombre
1	aagcgctcatcagcggttaaccatcacgggttcgggtgcgaaaaaccatgccataa caggaatgtccttgcgaaaattgaggaagccttatgccctcaaccctactagctgcc aattattccgggctgtgaccgctaccgataaataggtcggctgaaaaatttcgtgc aatatcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgcgcaccaagtactttgcgaagc gccatctqacggattttcaaaagatgtatatgctcgggtgcggaaacctac	promotor SOD (1)
63	tgacaattaatcatcggcctcgataatgt	promotor Tac1 (1)
64	tgacaattaatcatccggcctcgataatgt	promotor Tac2 (1)
65	tgacaattaatcatcggcctcgataatgt	promotor Trc (1)

El casete de expresión génica o la secuencia reguladora de la presente invención comprenden además por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en una secuencia de sitio de unión de ribosoma (RBS), una secuencia de espaciador y una secuencia de conector.

La secuencia de sitio de unión de ribosoma puede incluirse en por lo menos una o más copias, por ejemplo 1 a 5 copias, o 2 copias en la secuencia reguladora.

La secuencia reguladora incluye una primera secuencia RBS que incluye una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 2, y un primer espaciador que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 4 a SEC ID nº 6. Puede incluir, aparte de la primera secuencia RBS y la primera secuencia de espaciador, una segunda secuencia RBS que se conecta con el extremo 3' del primer espaciador directamente o mediante un conector, y una primera secuencia de espaciador y una segunda secuencia RBS que está conectada con el extremo 3' del primer espaciador directamente o mediante un conector, y un segundo espaciador.

Específicamente, la secuencia reguladora incluye una copia de secuencia RBS. Opcionalmente, la secuencia

reguladora incluye además una secuencia de conector de tamaño de 1 a 100 pb que está conectada con el extremo 3' del primer espaciador (promotor-RBS1-Espaciador1-conector).

La secuencia reguladora puede incluir dos copias de secuencia RBS. Por ejemplo, la secuencia reguladora puede incluir además, aparte del promotor de SEC ID nº 1, la primera secuencia RBS de SEC ID nº 2 y el primer espaciador seleccionado de entre el grupo que consiste en las secuencias de SEC ID nº 4 a SEC ID nº 6, por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en (i) una secuencia de conector de SEC ID nº 12 y (ii) un segundo espaciador seleccionado de entre el grupo que consiste en las secuencias de SEC ID nº 7 a nº 11. Por ejemplo, la segunda secuencia RBS puede conectarse con el extremo 3' del primer espaciador directamente o mediante un conector (promotor-RBS1-Espaciador1-RBS2, o promotor-RBS1-Espaciador1-conector-RBS2). En la secuencia reguladora, que incluye dos copias de secuencia RBS, un segundo espaciador puede conectarse con el extremo 3' de la segunda secuencia RBS. Además, la combinación del primer RBS y primer espaciador, o segundo RBS y segundo espaciador, puede repetirse por lo menos una o más veces, por ejemplo 1 a 5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces.

Los ejemplos específicos de secuencia reguladora no modificada se muestran a continuación:

- (1) un promotor y una combinación de RBS y secuencia de espaciador que están unidos al extremo 3' del promotor directamente o mediante un conector (por ejemplo, promotor-primer conector-RBS1-Espaciador1, o promotor-RBS-Espaciador1),
- (2) un promotor y por lo menos dos combinaciones de RBS y secuencia de espaciador (por ejemplo, promotor-RBS1-Espaciador1-RBS2-Espaciador2), y
- (3) un promotor, por lo menos dos combinaciones de RBS y secuencia de espaciador, y un segundo conector que está situado entre la primera secuencia de espaciador y el segundo RBS (por ejemplo, promotor-RBS1-Espaciador1-segundo conector-RBS2-Espaciador2).

En una primera forma de realización, la secuencia de sitio de unión de ribosoma es una secuencia de nucleótidos de un tamaño de 7 a 20 pb que incluye una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 2, por ejemplo una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 2. La secuencia de conector es una secuencia de nucleótidos de un tamaño de 5 a 100 pb, o de 5 a 80 pb, por ejemplo una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12.

La secuencia de conector puede ser un conector unido entre el promotor y el primer RBS, o un conector localizado entre el primer espaciador y el segundo RBS, y la secuencia de nucleótidos del conector puede seleccionarse para resultar adecuado para cada promotor. El promotor puede estar comprendido en la secuencia reguladora junto con el primer conector con una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12 situado entre el primer espaciador y el segundo RBS.

La secuencia de espaciador en la secuencia reguladora puede presentar una longitud de 3 a 15 bases de diversas bases, y el incremento de la eficiencia de expresión del gen situado en dirección 3' de la secuencia reguladora. La secuencia de espaciador puede prepararse en diversas composiciones de bases y longitudes de bases mediante la consideración del gen de interés, el tipo de célula hospedadora y similares.

La secuencia reguladora modificada de la presente invención incluye por lo menos una base que sustituye por lo menos una base de por lo menos una seleccionada de un primer espaciador y un segundo espaciador.

Por ejemplo, en el caso de que la secuencia reguladora modificada incluya una copia de RBS, la secuencia reguladora modificada incluye promotor, primer RBS y un primer espaciador del que TT de una primera base y una segunda base puede sustituirse por las bases GA, GT o GC.

En el caso de que la secuencia reguladora modificada incluya dos copias de RBS, TT de una primera base y una segunda base del primer espaciador conectado con el extremo 3' del primer RBS puede sustituirse por GA, GT o GC; TT de una primera base y una segunda base del segundo espaciador conectado con el extremo 3' del segundo RBS puede sustituirse por GG, GA, GT o GC; o TT de una primera base y una segunda base del primer espaciador puede sustituirse por GA, GT o GC y TT de una primera base y una segunda base del segundo espaciador puede sustituirse por GG, GA, GT o GC.

La primera secuencia de espaciador se selecciona del grupo que consiste en los nucleótidos de SEC ID nº 4 a nº 6. La segunda secuencia de espaciador puede ser por lo menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en los nucleótidos de SEC ID nº 7 a nº 11.

En una forma de realización, la secuencia de promotor, la secuencia RBS, el primer espaciador y el segundo espaciador y su secuencia modificada, y el conector que es aplicable a la secuencia reguladora, se ejemplifican en la tabla 2 (cabe destacar que el 1º espaciador R1TT de SEC ID nº 3 no es parte de la invención).

[Tabla 2]

SEC ID nº	secuencia (5' -> 3')	nombre
1	aagcgctcatcagcggttaaccatcacgggtcggtgcgaaaaacccatgccataacaggaatgttccttcgaaaattgaggaagccttatgccctcaaccctacttagctgccaattattccgggctgtgacccgctacccgataaataaggctggctgaaa	promotor
	aatttcgttgaatatcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtactttgcgaagcgccatcgacggattttcaaaagatgtatatgctcgggtgcggaacctac	
2	gaaagga	RBS
3	tttttaccc	1º ESPACIADOR R1TT
4	gattttaccc	1º ESPACIADOR R1GA
5	gtttttaccc	1º ESPACIADOR R1GT
6	gcttttaccc	1º ESPACIADOR R1GC
7	ttacaaa	2º ESPACIADOR, R2TT
8	gaacaaa	2º ESPACIADOR, R2GA
9	gtacaaa	2º ESPACIADOR, R2GT
10	gcacaaa	2º ESPACIADOR, R2GC
11	ggacaaa	2º ESPACIADOR, R2GG
12	atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac	conector

- 5 La secuencia reguladora puede incluir por lo menos un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en las secuencias mostradas en la tabla 3 (cabe destacar que las secuencias SEC ID nº 13 y nº 17 no forman parte de la presente invención) y regula la expresión de la psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp.

[Tabla 3]

SEC ID nº	secuencia (5' -> 3')	nombre
13	(SEC ID nº 1)+gaaagga tttttaccc	RBS1/1º ESPACIADOR-TT
14	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc	RBS1/1º ESPACIADOR-GA
15	(SEC ID nº 1)+gaaagga gtttttaccc	RBS1/1º ESPACIADOR-GT
16	(번호 1)+gaaagga gcttttaccc	RBS1/1º ESPACIADOR-GC
17	(SEC ID nº 1)+gaaagga tttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac	RBS1/1º ESPACIADOR-TT conector
18	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga ttacaaa	SOD-R1GA/R2TT
19	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga gaacaaa	SOD-R1GA/R2GA
20	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga gtacaaa	SOD-R1GA/R2GT
21	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga gcacaaa	SOD-R1GA/R2GC
22	(SEC ID nº 1)+gaaagga gattttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga ggacaaa	SOD-R1GA/R2GG
23	(SEC ID nº 1) +gaaagga gtttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga ttacaaa	SOD-R1 GT/R2TT
24	(SEC ID nº 1) + gaaagga gtttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac gaaagga gaacaaa	SOD-R1GT/R2GA

SEC ID nº	secuencia (5' -> 3')	nombre
25	(SEC ID nº 1) + gaaagga gttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga gtacaaa	SOD-R1GT/R2GT
26	(SEC ID nº 1) + gaaagga gttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga gcacaaa	SOD-R1GT/R2GC
27	(SEC ID nº 1) + gaaagga gttttaccc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga ggacaaa	SOD-R1GT/R2GG
28	(SEC ID nº 1) + gaaagga gcttttacc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga ttacaaa	SOD-R1GC/R2TT
29	(SEC ID nº 1) + gaaagga gcttttacc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga gaacaaa	SOD-R1GC/R2GA
30	(SEC ID nº 1) + gaaagga gcttttacc atggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgac gaaaqga gtacaaa	SOD-R1GC/R2GT
31	(SEC ID nº 1) + gaaagga gcttttacc atggctg tatacgaact ccagaactc gactacgat acgac gaaaqga gcacaaa	SOD-R1GC/R2GC
32	(SEC ID nº 1) + gaaagga gcttttacc atggctg tatacgaact ccagaactc gactacgat acgac gaaaqga ggacaaa	SOD-R1GC/R2GG

La tabla 4 muestra ejemplos, fuera del alcance de la presente invención, en los que la secuencia reguladora incluye un promotor controlado por Tac1 con la SEC ID nº 63, un promotor controlado por Tac2 con la SEC ID nº 64 o un promotor controlado por Trc, y la secuencia reguladora incluye por lo menos un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en las secuencias mostradas en SEC ID nº 66 a SEC ID nº 75 y regula la expresión de la psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp.

[Tabla 4]

SEC ID nº	secuencia (5' -> 3')	nombre
69	(SEC ID nº 63)+gaaagga	Tac1/RBS
70	(SEC ID nº 63)+ gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagaattcccgga gaaagga	Tac1/conector/RBS
71	(SEC ID nº 63)+ gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagaattcccgga gaaagga gaacaaa	Tac1/ conector /RBS/espaciador
72	(SEC ID nº 64)+gaaagga	Tac2/RBS
73	(SEC ID nº 64)+ gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagaattcccgga gaaagga	Tac2/ conector /RBS
74	(SEC ID nº 64)+ gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagaattcccgga gaaagga gaacaaa	Tac2/ conector /RBS/espaciador
75	(SEC ID nº 65) gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagacccatgg	Trc/conector

La secuencia reguladora de la presente invención puede regular la expresión de la psicosa epimerasa conectada con la secuencia reguladora en dirección 3' en *Corynebacterium* sp. Por lo tanto, el casete de expresión génica de la presente invención puede utilizarse para expresar el gen diana en *Corynebacterium* sp. Y el gen diana puede ser una secuencia de nucleótidos codificante de psicosa epimerasa. La psicosa epimerasa puede derivarse de

Clostridium scidens, *Treponema primitia*, o *Ensifer adhaerens*. La psicosa epimerasa derivada de *Agrobacterium tumefaciens* presenta una baja actividad enzimática y estabilidad térmica y, de esta manera, no resulta preferente.

El promotor derivado de *E. coli* muestra una actividad baja en *Corynebacterium* sp., debido a que el factor inductor de expresión presenta una baja permeabilidad y el material de expresión génica no existe en *Corynebacterium* sp. Aunque se utiliza el mismo promotor, la actividad de expresión del promotor puede variar según el gen diana que debe expresarse. El promotor aplicable a *Corynebacterium* sp. muestra una actividad de promotor baja y *Corynebacterium* sp. no proporciona una amplia selección de promotores. Por lo tanto, un promotor adecuado para *Corynebacterium* sp. no puede prepararse con facilidad. Aunque el promotor se utiliza convenientemente en *Corynebacterium* sp., el promotor puede presentar una actividad reguladora diferente de transcripción o expresión según el tipo de gen diana. El promotor, la secuencia reguladora y el casete de expresión génica de la presente invención se utilizan muy preferentemente para expresar psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp.

La secuencia codificante de la proteína diana puede conectarse con el extremo 3' de la secuencia reguladora utilizada en *Corynebacterium* sp. directamente o mediante un conector.

Preferentemente se utiliza una psicosa epimerasa con una actividad enzimática y estabilidad térmica elevados. Resulta importante combinar el promotor o la secuencia reguladora con la secuencia codificante de la psicosa epimerasa. La secuencia codificante de la psicosa epimerasa puede proporcionar un nivel de expresión preferente de la proteína, al utilizarlo con el promotor de la presente invención y puede obtenerse una elevada estabilidad térmica debido al pliegue correcto de la proteína. La secuencia codificante de la psicosa epimerasa según la presente invención preferentemente se utiliza junto con el promotor o la secuencia reguladora de la presente invención.

En una forma de realización, la psicosa epimerasa se deriva de *Clostridium scidens*, *Treponema primitia*, *Ensifer adhaerens* o *Ruminococcus torques*, y preferentemente por lo menos una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 33 a nº 36.

Con la condición de que la psicosa epimerasa mantenga la actividad enzimática de conversión de fructosa en psicosa, puede utilizarse cualquier secuencia modificada de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID nº 33 a nº 36 mediante la obtención de sustituciones, inserciones y/o deleciones del aminoácido parcial. Por ejemplo, la secuencia modificada puede incluir una secuencia de aminoácidos con una identidad de las secuencias de aminoácidos 70% o superior, de 80% o superior, de 90% o superior, de 95% o superior o de 99% o superior, en comparación con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 33 a nº 36.

La secuencia codificante de la psicosa epimerasa puede ser una secuencia de nucleótidos de psicosa epimerasa derivada de *Clostridium scidens*, *Treponema primitia*, *Ensifer adhaerens* o *Ruminococcus torques*, o una secuencia modificada obtenida mediante optimización de la secuencia codificante para que resulte adecuada para la expresión en *E. coli* o *Corynebacterium* sp.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos codificante de la psicosa epimerasa puede ser una secuencia codificante de entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las secuencias SEC ID nº 33 a nº 36. Específicamente, la secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera seleccionada de las secuencias SEC ID nº 37 a SEC ID nº 44, o una secuencia de nucleótidos que presenta sustancialmente la misma homología de secuencias a las mismas. La expresión sustancialmente la misma homología de secuencias se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de nucleótidos de 70% o superior, de 90% o superior o de 98% o superior, en comparación con por lo menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID nº 37 a SEC ID nº 44, en el caso de que cualquier secuencia de nucleótidos se alinee con la secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias SEC ID nº 37 a SEC ID nº 44 y se lleve a cabo el análisis de su secuencia.

En una forma de realización, la psicosa epimerasa derivada de *Clostridium scidens* (CDPE) incluye una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 33 y una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 33, por ejemplo la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 37 o SEC ID nº 38.

En una forma de realización, la psicosa epimerasa derivada de *Treponema primitia* (TDPE) incluye una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34 y una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34, por ejemplo la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 39 o SEC ID nº 40.

En una forma de realización, la psicosa epimerasa derivada de *Ensifer adhaerens* (EDPE) incluye una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35, por ejemplo la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 41 o SEC ID nº 42.

En una forma de realización, la psicosa epimerasa derivada de *Ruminococcus torques* (RDPE) incluye una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36 y una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36, por ejemplo la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 43 o SEC ID nº 44.

El casete de expresión génica de la presente invención puede comprender además por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en un origen de replicación, una secuencia líder, un marcador de selección, un sitio de clonación y un sitio de reconocimiento de enzima de restricción.

5 En otra forma de realización, se proporciona el casete de expresión génica útil para *Corynebacterium* sp. que comprende un promotor utilizado para *Corynebacterium* sp., una secuencia reguladora que incluye el promotor o la secuencia reguladora y un polinucleótido codificante del casete de expresión de la psicosa epimerasa de *Corynebacterium* sp.

10 El promotor utilizado para *Corynebacterium* sp., la secuencia reguladora y la psicosa epimerasa se han descrito anteriormente.

El casete de expresión génica de la presente invención puede comprender además por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en un origen de replicación, una secuencia líder, un marcador de selección, un sitio de clonación y un sitio de reconocimiento de enzima de restricción.

15 El casete de expresión génica puede utilizarse en un constructo de polinucleótido desnudo o en un vector recombinante. La expresión un vector recombinante se refiere a una molécula de nucleótidos que es capaz de transferir un polinucleótido diana que se encuentra operablemente ligado al vector recombinante. El polinucleótido diana puede conectarse operablemente con un regulador de la transcripción, tal como el promotor y un terminador de transcripción.

20 El vector recombinante puede ser un vector de clonación o un vector de expresión según un método ampliamente conocido de la técnica (Francois Baneyx, current Opinion Biotechnology 1999, 10:411-421). El vector recombinante puede ser cualquier vector que haya sido utilizado para la recombinación genética y puede ser cualquiera seleccionado de vectores plásmidos y vectores víricos (por ejemplo, retrovirus deficientes en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados) □₁ vector vírico con una actividad equivalente a la del vector. Entre los ejemplos de los vectores recombinantes se incluyen por lo menos un vector seleccionado de entre el grupo que consiste en los vectores pET, pKK223-3, pTrc99a, pKD, pXMJ19, pCES208 y similares. Preferentemente, el vector
30 puede ser un vector lanzadera de *E. coli-Corynebacterium* (pCES208, J. Microbiol. Biotechnol., 18:639-647, 2008).

De acuerdo con lo anterior, el vector que incluye el casete de expresión génica puede ser un vector de expresión, tal como un plásmido, que puede crecer en *Corynebacterium* sp. y expresar la proteína diana.

35 El terminador de transcripción puede ser un terminador rrnB, rrnB_T1, rrnB_T2, o T7, o preferentemente un terminador T7 derivado del vector pET21a.

El vector incluye un promotor con una secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID n° 1 o únicamente una secuencia reguladora sin el gen diana. El vector puede ser un vector lanzadera, un vector de replicación o un vector de expresión que pueda crecer en *E. coli* y *Corynebacterium* sp.

40 En particular, la presente invención proporciona un vector, tal como un plásmido que incluye una secuencia reguladora para regular la secuencia polinucleótidoa diana de expresión situada en dirección 5' de la secuencia polinucleótida diana. La secuencia reguladora incluye un promotor que presenta una secuencia de nucleótidos SEC ID n° 1, una secuencia de primer sitio de unión de ribosoma (RBS) y una primera secuencia de espaciador, tal como se ha indicado anteriormente.

45 La secuencia reguladora puede incluir además una segunda secuencia RBS conectada con el extremo 3' del primer espaciador directamente o mediante un conector. La secuencia reguladora puede incluir además una segunda secuencia RBS y una segunda secuencia de espaciador conectada con el extremo 3' de la segunda RBS directamente o mediante un conector.

50 En el vector que incluye el promotor, la secuencia del primer espaciador comprende una secuencia de nucleótidos modificada en la que la primera base y la segunda base (TT) en la secuencia de nucleótidos SEC ID n° 3 se han sustituido por GA, GT o GC. El primer espaciador modificado incluye una secuencia SEC ID n° 4, n° 5 o n° 6.

55 En el caso de que el vector incluya el primer espaciador y el segundo espaciador, el primer espaciador o el segundo espaciador o ambos puede incluir por lo menos una base modificada. Por ejemplo, la secuencia del segundo espaciador incluye una secuencia de nucleótidos modificada en la que la primera y la segunda base en la secuencia de nucleótidos SEC ID n° 7 se ha sustituido por GA, GT, GC o GG. La secuencia de nucleótidos modificada del segundo espaciador puede incluir una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias SEC ID n° 8 a n° 11.

60 Alternativamente, la primera y segunda bases (TT) de la secuencia del primer espaciador que presenta una secuencia de nucleótidos SEC ID n° 3 se sustituyen por GA, GT o GC, y la primera y la segunda bases (TT) de la
65

secuencia del segundo espaciador que presentan una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 7 pueden ser TT, GA, GT, GC o GG. Los ejemplos de secuencia del segundo espaciador son una secuencia de nucleótidos SEC ID nº 7 a nº 11.

5 En el vector que incluye únicamente una secuencia reguladora sin un gen diana, el casete de expresión y el vector que incluye el casete de expresión que incluye RBS, conector, primer espaciador, segundo espaciador, una secuencia codificante de psicosa epimerasa y una secuencia reguladora, son iguales a los indicados anteriormente.

10 En una forma de realización, se proporciona una célula recombinante de *Corynebacterium* sp. que incluye el casete de expresión génica o transformada con el casete de expresión.

El método de transformación de una célula hospedadora con el vector recombinante puede llevarse a cabo mediante cualquier método de transformación conocido por el experto ordinario en la materia sin limitación. Por
15 ejemplo, entre los ejemplos no limitativos del método se incluyen la fusión de protoplastos, la electroporación, el bombardeo de proyectiles y la infección con un vector vírico.

El *Corynebacterium* sp. transformado de la presente invención muestra una elevada estabilidad y eficiencia de expresión de psicosa epimerasa introducida y, de esta manera, puede mantener la elevada tasa de conversión de la psicosa durante un tiempo prolongado. El *Corynebacterium* sp. transformado puede aplicarse útilmente a la
20 producción de psicosa e incrementar el rendimiento de producción de la psicosa.

Pueden resultar un *Corynebacterium* sp. preferente, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* o *Corynebacterium efficiens*.
25

El *Corynebacterium* sp. transformado de la presente invención puede ser un *Corynebacterium glutamicum* recombinante.

30 El cultivo de *Corynebacterium* sp. puede llevarse a cabo en un medio adecuado según el método conocido de la técnica. El cultivo de la célula recombinante puede llevarse a cabo en un medio y bajo condiciones seleccionadas fácilmente según la propiedad de la cepa (célula hospedadora) por el experto en la materia. Por ejemplo, el cultivo puede ser un cultivo de tipo continuo, un cultivo de tipo semicontinuo, o un cultivo de tipo por lotes, aunque no se encuentra limitado a ellos. El medio de cultivo aplicable a la presente invención incluye una fuente de carbono, una
35 fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, vitamina y/o elementos traza. Entre las fuentes de carbono preferentes se incluyen sacáridos, tales como monosacárido, disacárido o polisacárido. Con el fin de mantener la concentración de iones metálicos, puede añadirse agente quelante al medio de cultivo. Todos los componentes del medio de cultivo pueden esterilizarse mediante calentamiento a 1,5 bar y 121°C durante 20 minutos, o la esterilización mediante filtración.

40 En una forma de realización, puede proporcionarse la utilización de una composición que incluye por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una célula de *Corynebacterium* sp. recombinante, un cultivo de células de *Corynebacterium* sp. recombinantes, un lisado de las células de *Corynebacterium* sp. recombinantes y un extracto de dicho cultivo celular o dicho lisado celular, en el que las células de *Corynebacterium* sp.
45 recombinantes incluyen un casete de expresión celular o un vector tal como se ha indicado anteriormente, para la producción de psicosa epimerasa y/o psicosa.

En otra forma de realización, puede proporcionarse un método para producir psicosa incluye una etapa de reacción de un sustrato que contiene fructosa con una composición para la producción de psicosa, que incluye por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una psicosa epimerasa obtenida mediante la utilización de la *Corynebacterium* sp. recombinante, una célula recombinante, un cultivo de la célula recombinante, un lisado de las células recombinantes y un extracto del cultivo celular o lisado celular.
50

El cultivo puede contener una proteína enzima producida a partir de la célula de *Corynebacterium* sp. recombinante y puede incluir la célula recombinante o puede, alternativamente, encontrarse en una forma libre de células. El lisado puede resultar de la lisis de la célula recombinante o puede incluir un sobrenadante obtenido mediante centrifugación del lisado, de manera que contiene la proteína enzimática producida a partir de la célula recombinante en ambos casos. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la célula recombinante se refiere a por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en una masa celular de la cepa, un
55 cultivo de la cepa y un lisado de la cepa.

El método de producción de psicosa incluye una etapa de hacer reaccionar el *Corynebacterium* sp. con sustrato que contiene fructosa. En una forma de realización, la reacción entre las proteínas enzimáticas y la fructosa puede llevarse a cabo mediante el cultivo de una masa celular de la célula recombinante en un medio que contiene fructosa. La reacción del *Corynebacterium* sp. con sustrato que contiene fructosa puede llevarse a cabo poniendo
65 en contacto el *Corynebacterium* sp. con fructosa que puede ser la fructosa en contacto con 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. Además, la reacción del *Corynebacterium* sp. con sustrato que contiene fructosa puede llevarse a cabo mediante la mezcla de *Corynebacterium* sp. con fructosa, o poniendo en contacto el *Corynebacterium* sp. inmovilizado en el sustrato con fructosa, de manera que se convierte la fructosa en psicosa.

Para la producción eficaz de psicosa en el método, se utiliza 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). Una concentración más baja que el límite inferior de fructosa puede reducir la viabilidad económica de la psicosa de esta manera. Por otra parte, en caso de hallarse presente a una concentración más elevada que el límite superior, la fructosa es menos fácil de disolver. Por lo tanto, la concentración preferentemente se encuentra comprendida dentro del intervalo. La fructosa puede encontrarse en forma de una solución en un tampón o en agua (por ejemplo, agua destilada).

La reacción puede llevarse a cabo a un pH de 6 a 9.5, por ejemplo a un pH de 7 a 9, a un pH de 7 a 8, a un pH de 8 a 9; la reacción puede llevarse a cabo bajo la condición de temperatura de 40°C o superior, por ejemplo a 4°C o superior. En el caso de que la reacción pueda llevarse a cabo a una temperatura de 80°C, el sustrato fructosa puede presentar una tendencia a pardearse. Por lo tanto, la reacción puede llevarse a cabo bajo la condición de temperatura de 40°C a 80°C, por ejemplo de 50°C a 75°C, de 60°C a 75°C o de 68°C a 75°C.

Además, un periodo de reacción más prolongado conduce a una tasa de conversión más elevada de psicosa. Se recomienda llevar a cabo la reacción durante 1 h o más, por ejemplo 2 h o más, 3 h o más, 4 h o más, 5 h o más o 6 h o más. Sin embargo, el tiempo de reacción preferentemente se fija dentro de las 48 h, ya que en el caso de que el tiempo de reacción se extienda durante 48 h, el incremento de la tasa de conversión de psicosa se vuelve pequeño o puede reducirse. Por lo tanto, el tiempo de reacción puede fijarse en el intervalo de 1 a 48 h, de 2 a 48 h, de 3 a 48 h, de 4 a 48 h, de 5 a 48 h o de 6 a 48 h. Considerando los aspectos industriales y económicos, el tiempo de reacción puede encontrarse comprendido dentro del intervalo de 1 a 48 h, de 2 a 36 h, de 3 a 24 h, de 3 a 12 h o de 3 a 6 h, aunque no se encuentra limitado a ellos. Dicha condición se selecciona a fin de maximizar el rendimiento de conversión de fructosa en psicosa.

Además, en el caso de que se utilice la célula recombinante en el método de producción de psicosa, su concentración puede fijarse en el intervalo de 5 mg(dcw, peso celular seco)/ml o más elevado en la mezcla de reacción entera, por ejemplo en el intervalo 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. En el caso de que la concentración de la masa celular sea más baja que el límite inferior, se muestra poca o ninguna actividad de conversión de la psicosa. Por otra parte, una concentración que exceda el límite superior se refiere al amontonamiento de las células que es probable que actúan obstruyendo la optimización del rendimiento de conversión entero de la psicosa.

La proteína enzimática con actividad de conversión de psicosa (por ejemplo, la psicosa epimerasa) puede mostrar la propiedad de un metaloenzima, la actividad del cual está controlada por iones metálicos. Por lo tanto, la presente de un ion metálico puede estimular la reacción catalizada por la proteína enzimática, incrementando de esta manera el rendimiento de producción de psicosa.

Por lo tanto, la composición para la producción de psicosa puede comprender además un ion metálico. El método para producir psicosa puede comprender además la adición de un ion metálico. En una forma de realización, el ion metálico puede añadirse al medio de cultivo en el procedimiento de cultivo, o puede añadirse durante el procedimiento de cultivo.

En otra forma de realización, el ion metálico puede añadirse a fructosa o a una mezcla de fructosa y *Corynebacterium* sp. El ion metálico puede añadirse a un soporte en el que se inmovilizan las proteínas enzimáticas (antes de la adición de D-fructosa) o a una mezcla de un soporte con proteína enzimática inmovilizada y D-fructosa (después de la adición de D-fructosa) o puede añadirse en mezcla con D-fructosa o individualmente junto con D-fructosa.

El ion metálico que puede contribuir a una mejora del rendimiento de producción de psicosa puede seleccionarse del grupo que consiste en un ion cobre, un ion manganeso, un ion calcio, un ion magnesio, un ion cinc, un ion níquel, un ion cobalto, un ion hierro, un ion aluminio y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, puede utilizarse un ion de cobalto o un ion de cobalto o ambos. Considerando la mejora del rendimiento de producción de psicosa, el ion metálico puede añadirse en una cantidad de 0.5 mM o superior. En el caso de que la cantidad de ion metálico exceda de 5 mM, el efecto de adición resulta insignificante respecto a la cantidad en exceso. Por lo tanto, la cantidad del ion metálico se fija en 5 mM o menos. Por ejemplo, el ion metálico se utiliza en una cantidad de 0.5 mM a 5 mM, por ejemplo, de 0.5 mM a 2 mM.

Con la condición de que establezca un medio para mantener la actividad de la cepa o la proteína enzimática producida a partir de la cepa durante un periodo de tiempo prolongado, puede utilizarse cualquier soporte configurado para inmovilizar la cepa o la proteína enzimática en el mismo. Por ejemplo, como soporte puede servir alginato sódico. El alginato sódico, un polisacárido coloidal natural presente en abundancia en las paredes

celulares de las algas pardas, consiste en ácido β -D-manurónico y ácido α -L-glucurónico, con un enlace covalente β 1-4 entre ellos. Permite la inmovilización estable de la enzima o el enzima al mismo; el polímero lineal puede resultar ventajoso para el rendimiento de producción de psicosa.

En una forma de realización, puede utilizarse una solución al 1.5 ~ 4.0% (p/v) de alginato sódico (por ejemplo, solución acuosa de alginato sódico), por ejemplo, puede utilizarse una solución aproximadamente al 2.5% (p/v) de alginato sódico para inmovilizar la cepa. A título de ejemplo, una masa celular de la cepa, un caldo de cultivo que contiene el enzima producido por la cepa, o un lisado de la cepa, se mezcla con 1 a 2 volúmenes de una solución acuosa de alginato sódico y la mezcla se añade gota a gota a una solución 0.2 M de ion calcio utilizando una bomba de jeringa y una bomba de vacío, formando perlas en las que se inmoviliza la masa celular de la cepa, el cultivo que contiene el enzima producido por la cepa, o el lisado de la cepa. El enzima puede purificarse a partir de la cepa, un cultivo de la cepa o un lisado de la cepa utilizando un método típico, por ejemplo diálisis, precipitación, adsorción, electroforesis, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico.

El método de producción de psicosa comprende la reacción de las proteínas enzimáticas con D-fructosa. En una forma de realización, la reacción entre las proteínas enzimáticas y la D-fructosa puede llevarse a cabo mediante la puesta en contacto de las proteínas enzimáticas con D-fructosa.

En una forma de realización, la reacción entre las proteínas enzimáticas y la fructosa puede llevarse a cabo mediante la puesta en contacto de las proteínas enzimáticas con fructosa. En otra forma de realización, el contacto entre las proteínas enzimáticas y la fructosa puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la mezcla de las proteínas enzimáticas con fructosa o poniendo en contacto fructosa con las proteínas enzimáticas inmovilizadas en un soporte. En una forma de realización adicional, la reacción entre las proteínas enzimáticas y la fructosa puede llevarse a cabo mediante el cultivo de una masa celular de la célula recombinante en un medio que contiene fructosa. La reacción de las proteínas enzimáticas con fructosa conduce a la conversión y, de esta manera, la producción de psicosa a partir de D-fructosa.

En el método de producción de psicosa, puede conseguirse eficiencia en la producción de psicosa al utilizar las proteínas enzimáticas a una concentración de 0.001 mg/ml a 1.0 mg/ml en la mezcla de reacción, a una concentración de 0.005 mg/ml a 1.0 mg/ml, a una concentración de 0.01 mg/ml a 1.0 mg/ml, a una concentración de 0.01 mg/ml a 0.1 mg/ml, o a una concentración de 0.05 mg/ml a 0.1 mg/ml. En el caso de que las proteínas enzimáticas se utilicen a una concentración más baja que el límite inferior, el rendimiento de conversión de psicosa puede ser bajo. Por otra parte, una concentración excesivamente elevada de las proteínas enzimáticas reduce la economía industrial de la producción de psicosa.

Para la producción eficaz de psicosa en el método, se utiliza 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). Una concentración más baja que el límite inferior de fructosa puede reducir la viabilidad económica de la psicosa de esta manera. Por otra parte, en caso de hallarse presente a una concentración más elevada que el límite superior, la fructosa es menos fácil de disolver. Por lo tanto, la concentración preferentemente se encuentra comprendida dentro del intervalo. La fructosa puede encontrarse en forma de una solución en un tampón o en agua (por ejemplo, agua destilada).

Mediante la consideración de las condiciones óptimas de la reacción de proteína enzima, puede ajustarse el pH, temperatura y concentración de enzima de la reacción. Por ejemplo, el pH de la reacción puede ser de 6 a 9, o la temperatura puede ser de 30°C o superior, por ejemplo de 40°C o superior, debido a que la fructosa puede presentar una tendencia al pardeamiento a 80°C o a una temperatura más elevada. Además, un periodo de tiempo de reacción más prolongado conduce a una tasa de conversión más elevada de psicosa. Se recomienda llevar a cabo la reacción durante 1 h o más, debido a la estabilidad térmica del enzima (a 50°C). En el caso de que el tiempo de reacción exceda de 8 horas, no puede presentar ningún efecto significativo sobre la tasa de conversión de la psicosa o puede reducir la tasa de conversión. De esta manera, el tiempo de reacción es preferentemente de 8 horas o menos.

En el caso de que la célula recombinante se utilice en el método de producción de psicosa, su concentración puede fijarse en el intervalo de 5 mg (dcs: peso celular seco)/ml o más en la mezcla de reacción entera.

En una forma de realización, el método para producir psicosa puede comprender una etapa de hacer reaccionar la fructosa con una célula recombinante que expresa psicosa epimerasa o la psicosa epimerasa separada de la célula recombinante. En una forma de realización, el método para producir psicosa puede comprender el cultivo y recuperación de una célula recombinante.

Tras la producción a partir de fructosa utilizando el método de la presente invención, puede purificarse psicosa mediante un método típico que puede ser fácilmente seleccionado por el experto en la materia, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en centrifugación, filtración, cristalización, cromatografía de intercambio iónico y una combinación.

Efectos ventajosos

Un sistema de expresión génica que expresa la psicosa epimerasa en una gran cantidad con un microorganismo GRAS tal como *Corynebacterium* sp., un vector y *Corynebacterium* sp. se proporcionan según la presente invención, y la psicosa epimerasa obtenida mediante la utilización del sistema de expresión génica puede producir psicosa a partir del sustrato que contiene fructosa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un mapa de escisión de un vector recombinante para la expresión de proteína psicosa 3-epimerasa según una forma de realización de la presente invención.

La figura 2 es un dibujo que muestra la cantidad de proteína mediante la utilización de SDS-PAGE de lisado de células de *Corynebacterium* sp. cultivadas mediante la utilización de un molino de perlas.

Las figuras 3 a figura 5 muestran mapas de escisión de vectores recombinantes, que comprenden promotores que no son parte de la presente invención, para la expresión de proteína psicosa 3-epimerasa en células de *Corynebacterium* sp., es decir, un vector recombinante (pCES_tac1CDPE) en la figura 3, un vector recombinante (pCES_tac2CDPE) en la figura 4, un vector recombinante (pCES_TrCDPE) en la figura 5.

La figura 6 es un dibujo que muestra la comparación de las cantidades de proteínas expresadas obtenidas mediante lisis de las células en cultivo con un molino de perlas y el análisis mediante SDS-PAGE.

La figura 7 es un gráfico que compara la velocidad inicial de reacción celular en la tasa de conversión lineal de psicosa.

La figura 8 es un gráfico que compara la estabilidad térmica a 50°C en la reacción celular de células que expresan CDPE.

Modo de invención

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1. Producción de plásmido SOD

Ejemplo 1-1: producción de vector con promotor *sod*

La secuencia de nucleótidos (gen CDPE, GenBank: EDS06411.1) codificante de psicosa epimerasa derivada de *Clostridium scindens* ATCC 35704 se optimizó para *E. coli* a fin de producir una secuencia de nucleótidos modificada, que se denominó CDPE. El polinucleótido optimizado (SEC ID n° 36, la secuencia reguladora *sod* (SEC ID n° 17: promotor *sod*-RBS-ESPACIADOR R11T-CONECTOR) derivado de ADN_g de *Corynebacterium* y terminador T7 del vector pET21a se amplificó mediante el método de PCR para producir cada molde y se ligó a un molde siguiendo el método de PCR solapante. El molde se clonó en el vector pGEM T-easy según el método de clonación de vector T y se analizó para la secuencia. Específicamente, el polinucleótido incluía la secuencia reguladora *sod* de SEC ID n° 17, la secuencia codificante de CDPE optimizada para *E. coli* de SEC ID n° 36 y el terminador T7.

Se insertó el polinucleótido completo en el mismo sitio de reconocimiento de restricción de pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol. 18:639-647, 2008) con los enzimas de restricción NotI y XbaI (NEB) para producir el vector recombinante de pCES208/psicosa epimerasa (pCES_sodCDPE). El mapa de escisión del vector recombinante (pCES_sodCDPE) se muestra en la figura 1.

Ejemplo 1-2: producción de vector con mutagénesis de saturación

Con el fin de preparar un vector utilizando la mutagénesis de saturación, se prepararon los cebadores incluyendo -NN- como un sitio diana. Específicamente, se decidió TT en el extremo 3' del primer RBS (GAAGGA) y el segundo RBS como sitio diana y se solicitó a Genotec que sintetizase el cebador. Las secuencias de cebador, el sitio de mutagénesis de saturación y el sitio de unión a cebador se resumen en la tabla 5.

[Tabla 5]

Nombre del cebador	secuencia (5' -> 3')	SEC ID n°
RBS1_F	GGTGCGGAAACCTACGAAAGGANNTTTTACCCATGGCTGTATACG AAC	45

Nombre del cebador	secuencia (5' -> 3')	SEC ID nº
RBS1_R	GTTCGTATACAGCCATGGGTAAAANNTCCTTTTCGTAGGTTTCCGC ACC	46
RBS2_F	GACTACGCATACGACGAAAGGANNACAAAATGAAACACGGTATCT ACTAC	47
RBS2_R	GTAGTAGATACCGTGTTCATTTGTNNTCCTTTTCGTCTGATGCGT AGTC	48

El fragmento frontal y el fragmento trasero divididos por un sitio de referencia de -NN- se obtuvieron mediante PCR para producir un molde según el método de PCR solapante. Se insertó el molde en el plásmido pCES208 mediante ligación con los sitios XbaI y NotI, a fin de obtener el plásmido según la mutagénesis de saturación.

Ejemplo 2. Transformación y cribado de *E. coli* transformado

Ejemplo 2-1: transformación de *E. coli*

Se transformó la cepa *E. coli* Dh10b con el plásmido obtenido en el ejemplo 1 mediante electroforesis y se cribó. Específicamente, se vertió canamicina en un tubo de 1.5 ml hasta una concentración final de canamicina de 15 µg/ml y se añadió 1 ml de LB (triptona 10 mg/l, NaCl 10 mg/l, extracto de levadura 5 mg/l). Las colonias seleccionadas aleatoriamente se inocularon en la placa y se cultivaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas. A continuación, se recolectó la célula para eliminar el medio de cultivo, se hizo reaccionar con fructosa al 50% (sustrato) disuelta en tampón PIPES 50 mM (pH 7.0) mediante la adición de Mn²⁺ 1 mM a 60°C durante 30 minutos y se desactivó a 100°C durante 5 minutos.

Ejemplo 2-2: cribado con tasa de conversión de psicosa

El producto del ejemplo 2-1 se analizó mediante análisis de CL para comparar la tasa de conversión de la psicosa con la de pCES_sodCDPE. A continuación, se seleccionó el transformante con el gen modificado con la tasa de conversión más elevada. Específicamente, se obtuvo la tasa de conversión mediante el análisis del pico de CL del sustrato (fructosa) y del producto (psicosa) y la superficie del pico.

La comparación de la superficie del pico de CL confirmó el grado decreciente de producción de psicosa y el consumo de sustrato. Se obtuvieron las curvas patrón mediante la preparación de las muestras con diferentes concentraciones de fructosa, de 10, 20, 50, 100, 120, 150 mM y las muestras con diferente concentración de psicosa, de 1, 2, 5, 10, 20, 50 mM, con R² de 0.99 o superior. A continuación, se infirió cada fórmula a partir de las curvas patrón y se obtuvo la concentración de fructosa y la concentración de psicosa mediante la utilización de la superficie del pico de CL.

Los valores finales se indicaron como la tasa de conversión de psicosa, que era proporcional a la cantidad de CDPE expresado. De esta manera, a medida que se incrementa la cantidad de psicosa producida, se incrementa la cantidad de CDPE expresado.

En consecuencia, se seleccionaron 6 mutantes, incluyendo tres mutantes en el sitio R1 y 3 mutantes en el sitio R2, y se denominaron R1-1, R1-4, R1-8, R2-1, R2-5 y R2-11. En comparación con el resultado del análisis de CL del control que incluía secuencias no modificadas (pCES_sod CDPE), se seleccionaron cuatro mutantes basándose en la tasa de conversión de psicosa y se muestran en la tabla 6.

[Tabla 6]

Muestra	Tasa de conversión de psicosa (%)
sod_CDPE	5.15
R1-1	8.59
R1-4	8.94
R2-5	5.66
R2-11	6.07

Tal como se muestra en la tabla 6, los mutantes finalmente seleccionados que mostraban una tasa de conversión incrementada de psicosa eran R1-1 y R1-R en el sitio R1 y R2-5 y R2-11 en el sitio R2 y, de esta manera, 4 mutantes mostraron una expresión incrementada de CDPE.

Ejemplo 2-3: identificación de secuencia modificada

Basándose en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 3, en el pCES_sodCDPE no modificado, R1-1 presentaba

la sustitución de GA y R1-4 presentaba la sustitución de GG en TT del sitio diana de control.

Basándose en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 7 en pCES_sodCDPE no mutado, R2-5 y R2-11 presentaba GG sustituido en TT del sitio diana de control.

Ejemplo 3. Medición de la tasa de expresión de CDPE en *Corynebacterium*

Se transformó *Corynebacterium glutaricum* con 4 mutantes obtenidos en el ejemplo 2, respectivamente, y se obtuvieron mediante su cultivo en 100 ml de medio LB. Se lisaron las células y se purificaron mediante la utilización del método de purificación de etiqueta de His. A continuación, se llevó a cabo el SDS-PAGE del lisado celular a fin de identificar la tasa de conversión de CDPE.

Específicamente, las células cultivadas se lisaron con un molino de perlas y se recogió el sobrenadante, se mezcló con tampón para muestras en proporción 1:1 y se calentó a 100°C durante 5 minutos. La muestra preparada se analizó mediante electroforesis mediante la utilización de gel de SDS-PAGE al 12% (composición: gel de migración - 3.3 ml de H₂O, 4.0 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de tampón Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 µl de SDS al 10%, 100 µl de APS al 10%, 4 µl de TEMED / gel de carga - 1.4 ml H₂O, 0.33 ml de acrilamida al 30%, 0.25 ml de tampón Tris 1.0 M (pH 6.8), 20 µl de SDS al 10%, 20 µl de APS al 10%, 2 µl de TEMED) a 180 V durante 50 minutos a fin de identificar la expresión de las proteínas.

Tras identificar la expresión de CDPE en el gel de SDS-PAGE, el producto se purificó según el método de purificación de etiqueta de His utilizando resina de Ni-NTA y se calculó la tasa de conversión de psicosa mediante la utilización de la fórmula de tasa de conversión (%)=(proteína purificada (mg) / proteínas solubles totales (mg)) * 100). La tasa de conversión calculada se indica en la tabla 7.

En la tabla 7 a continuación, proteínas celulares completas se refieren a todas las proteínas dentro de la célula que expresa la psicosa epimerasa celular y la cantidad de psicosa epimerasa se refiere a la cantidad de psicosa epimerasa purificada. Por lo tanto, la tasa de conversión se refiere a valor calculado que muestra la proporción de proteína diana expresada respecto a las proteínas celulares totales.

[Tabla 7]

Muestra	Tasa de conversión de CDPE (%)
Sod CDPE	10
R1-1	15
R1-4	9.5
R2-5	8.3
R2-11	8.5

Tal como se muestra en la tabla 7, la concentración de CDEP purificada de R1-1 era aproximadamente 1.5 veces más alta que en el transformante con el vector recombinante (pCES_sodCDPE). Por otra parte, otras muestras mostraron una tasa de conversión baja.

Ejemplo 4. Producción de psicosa mediante la utilización de reacción enzimática

Se transformó *Corynebacterium glutaricum* con 4 mutantes: R1-1, R1-4, R2-5 y R2-11 obtenidos en el ejemplo 2, respectivamente, y se obtuvieron mediante su cultivo en 100 ml de medio LB. El enzima en bruto no purificado se utilizó para convertir sustrato que contenía fructosa 50 mM en psicosa. A continuación, se analizó la cantidad de psicosa producida.

Las células mutantes que expresaban CDPE se rompieron. Se obtuvo sobrenadante que incluía la proteína, de concentración 0.007 mg/ml de proteínas celulares completas, y se añadió al sustrato que contenía fructosa 50 mM con adición de Mn²⁺ 1 mM. A continuación, se llevó a cabo la reacción a pH 7.0, PIPES 50 mM y a 60°C durante 5, 10 o 15 minutos, y después se desactivó con calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

Se comparó la tasa de conversión de psicosa mediante análisis de CL. Específicamente, se obtuvo la tasa de conversión mediante el análisis del pico de CL del sustrato (fructosa) y del producto (psicosa) y la superficie del pico.

El análisis de CL se llevó a cabo mediante la utilización del detector de índice de refracción (Agilent 1260 RID) de HPLC (Agilent, EE.UU.) dotado de una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD), agua a 80°C como fase móvil y caudal de columna de 0.6 ml/min. A continuación, se calculó la tasa de conversión de psicosa basándose en la fórmula de tasa de conversión mediante la utilización de la cantidad de psicosa producida y fructosa no consumida medida a partir del pico de CL. Los valores calculados se muestran en la tabla 8.

[Fórmula]

Tasa de conversión (%) = cantidad de psicosa producida (g/l) / (cantidad de psicosa producida + cantidad de fructosa remanente) (g/l) * 100

[Tabla 8]

Muestra	Tasa de conversión de psicosa (%) en la reacción durante 5 minutos
Sod-CDPE	15.66
R1-1	17.24
R1-4	14.39
R2-5	14.10
R2-11	13.65

Tal como se muestra en la tabla 5, la tasa de conversión de R1-1 era más alta que sod-CDPEII. Otras secuencias modificadas mostraban una cierta reducción de la tasa de conversión en comparación con sod-CDPE.

Ejemplo 5. Producción de psicosa mediante la utilización de la reacción de células de *Corynebacterium*

Se transformó *Corynebacterium glutaricum* con 4 mutantes: R1-1, R1-4, R2-5 y R2-11 obtenidos en el ejemplo 2, respectivamente, y se obtuvieron mediante su cultivo en 100 ml de medio LB. El sustrato que contenía 50% en peso de fructosa se hizo reaccionar mediante la utilización de la reacción celular y se comparó la tasa de conversión.

Específicamente, se añadieron 0.5 a 2 mg/ml de células mutantes que expresaban CDPE al sustrato que contenía fructosa en un contenido de sólidos de 50% en peso y Mn^{2+} 1 mM, se hicieron reaccionar a pH 7.0, PIPES 50 mM y a 60°C y se desactivaron mediante calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

La reacción de conversión se llevó a cabo mediante la utilización de cada célula mutante y se calculó la tasa de conversión según el método de análisis de CL. El análisis de CL se llevó a cabo mediante la utilización del detector de índice de refracción (Agilent 1260 RID) de HPLC (Agilent, EE.UU.) dotado de una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD), agua a 80°C como fase móvil y caudal de columna de 0.6 ml/min. A continuación, se calculó la tasa de conversión de psicosa basándose en la fórmula de tasa de conversión mediante la utilización de la cantidad de psicosa producida y fructosa no consumida medida a partir del pico de CL. Los valores calculados se muestran en la tabla 9.

[Fórmula]

Tasa de conversión (%) = cantidad de psicosa producida (g/l) / (cantidad de psicosa producida + cantidad de fructosa no consumida) (g/l) * 100

[Tabla 9]

Muestra	Tasa de conversión de psicosa (%)
Sod-CDPEII	6.02
R1-1	8.34
R1-4	5.99
R2-5	4.79
R2-11	5.29

Tal como se muestra en la tabla 9, la tasa de conversión de R1-1 mutante era más alta que sod-CDPEII. Otras secuencias modificadas mostraban una cierta reducción de la tasa de conversión en comparación con sod-CDPE.

Ejemplo 6: comparación de la estabilidad térmica en la reacción de células de *Corynebacterium*

Aparte de la elevada tasa de conversión de la célula, la célula que convierte la psicosa epimerasa establemente asimismo resulta importante en el campo industrial. Por lo tanto, el presente experimento se llevó a cabo para confirmar la estabilidad térmica de la célula.

Con el fin de confirmar la estabilidad térmica de la célula a 50°C, se resuspendieron 1,0 mg/ml de células pretratadas con surfactante, en tampón PIPES 50 mM (pH 7.0) y se calentaron a 50°C. Las células se muestrearon cada hora de calentamiento y se utilizaron para la reacción de conversión en la que se añadieron las células muestreadas al sustrato que contenía fructosa al 50% y Mn^{2+} 1 mM y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60

minutos.

La tasa de conversión de psicosa y la medida decreciente de las células muestreadas se muestran en la tabla 10 mediante la referencia al cero de tasa de conversión y el cero de tiempo de calentamiento.

5

[Tabla 10]

Minutos de reacción	Tasa de conversión de psicosa (%) de pCES_sodCDPE	Estabilidad térmica relativa de pCES_sodCDPE	Tasa de conversión de psicosa (%) de R1-1	Estabilidad térmica relativa de R1-1
0	8.4	100	11.62	100
120	7.5	89.21	10.77	92.7
240	7.27	86.56	9.56	82.27
360	7.02	83.52	9.03	77.74
540	6.81	81.05	9.19	79.1
840	6.54	77.88	8.9	76.6
1020	6.52	77.65	8.4	72.31
1200	6.15	73.17	7.32	62.98
1320	5.94	70.64	8.04	69.24
1560	5.92	70.42	8.15	70.14
1680	5.71	67.92	7.75	66.75
1740	5.24	62.32	6.82	58.73

10 Tal como se muestra en la tabla 10, la estabilidad térmica de R-1 no era diferente de pCES_sodCDPE y, de esta manera, R1-1 mutante presentaba una buena estabilidad térmica. La semivida de R-11 se esperaba que fuese de aproximadamente 1800 minutos.

Ejemplo 7: producción de secuencia reguladora modificada y expresión de CDPE

15 Ejemplo 7-1: producción de vector que incluye una secuencia reguladora modificada

TT en el extremo 3' del primer RBS (GAAGGA) y del segundo RBS se decidió que sería el sitio diana y se solicitó a Genotec que sintetizase el cebador -NN- a fin de sustituir TT por GT, GC o GG. Las secuencias de cebador, el sitio de mutagénesis de saturación y el sitio de unión a cebador se resumen en la tabla 11.

20

[Tabla 11]

Cebador	secuencia (5' -> 3')	SEC ID nº
RBS1GT_F	GGTGCGGAAACCTACGAAAGGAGTTTTACCCATGGCTGTATAC GAAC	49
RBS1GT_R	GTTCGTATACAGCCATGGGTAAAACTCCTTTCGTAGGTTTCCGC ACC	50
RBS1GC_F	GGTGCGGAAACCTACGAAAGGAGCTTTTACCCATGGCTGTATAC GAAC	51
RBS1GC_R	GTTCGTATACAGCCATGGGTAAAAGCTCCTTTCGTAGGTTTCCGC ACC	52
RBS1GG_F	GGTGCGGAAACCTACGAAAGGAGTTTTACCCATGGCTGTATAC GAAC	53
RBS1GG_R	GTTCGTATACAGCCATGGGTAAAACCTCCTTTCGTAGGTTTCCGC ACC	54

25 El fragmento frontal y el fragmento trasero divididos por un sitio de referencia de -NN- se obtuvieron mediante PCR para producir un molde según el método de PCR solapante. Se insertó el molde en el plásmido pCES208 mediante ligación con los sitios XbaI y NotI, a fin de obtener el plásmido según la mutagénesis de saturación.

Ejemplo 7-2: medición de la tasa de expresión de CDPE

30 Se transformó *Corynebacterium glutarium* con el plásmido que incluía la secuencia mutada obtenida en el ejemplo 7-2, se cultivó en 100 ml de medio LB y se lisó y se purificó según el método de purificación de etiqueta de His utilizando una resina de Ni-NTA. Se midió la concentración de proteínas celulares completas y de la proteína purificada (CDPE) según el ensayo de Bradford y se calculó la tasa de conversión de la proteína diana.

35 Específicamente, las células cultivadas se lisaron con un molino de perlas y se recogió el sobrenadante, se mezcló

con tampón para muestras en proporción 1:1 y se calentó a 100°C durante 5 minutos. La muestra preparada se analizó mediante electroforesis mediante la utilización de gel de SDS-PAGE al 12% (composición: gel de migración - 3.3 ml de H₂O, 4.0 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de tampón Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 µl de SDS al 10%, 100 µl de APS al 10%, 4 µl de TEMED / gel de carga - 1.4 ml H₂O, 0.33 ml de acrilamida al 30%, 0.25 ml de tampón Tris 1.0 M (pH 6.8), 20 µl de SDS al 10%, 20 µl de APS al 10%, 2 µl de TEMED) a 180 V durante 50 minutos a fin de identificar la expresión de las proteínas. La figura 2 es un dibujo que muestra la cantidad de proteínas mediante la utilización de SDS-PAGE de lisado de un cultivo celular de *Corynebacterium* sp. mediante la utilización de un molino de perlas.

Tras identificar la expresión de CDPE en el gel de SDS-PAGE, el producto se purificó según el método de purificación de etiqueta de His utilizando resina de Ni-NTA y se calculó la tasa de conversión de psicosa mediante la utilización de la fórmula de tasa de conversión (%)=(proteína purificada (mg) / proteínas solubles totales (mg)) * 100). La tasa de conversión calculada se indica en la tabla 12.

[Tabla 12]

Plásmido	Proteínas celulares completas (mg)	Enzima psicosa epimerasa (mg)	Tasa de conversión (%)
pCES_sodCII	10.7	1.1	10.3
R1GA	11.5	1.7	14.8
R1GT	10.9	1.6	14.7
R1GC	8.2	0.8	9.8
R1GG	10.8	0.7	6.5

Tal como se muestra en la tabla 12, las tasas de conversión de R1-GA y R1GT eran más alta que pCES_sodCDPE. R1GC mostraba una actividad enzimática similar y R1GG mostraba una actividad enzimática reducida.

Ejemplo 7-3: producción de psicosa con la reacción celular

Según un método sustancialmente igual al del ejemplo 5, se transformó la cepa de *Corynebacterium* con mutantes cultivados en 100 ml de medio LB, respectivamente, y se añadieron a la reacción de conversión de psicosa para comparar la tasa de conversión de psicosa. Se muestran los resultados en la tabla 13.

[Tabla 13]

Muestra	Tasa de conversión de psicosa (%)	Tasa de conversión relativa (%)
R1GG	4.58	100
R1TT	6.73	147
R1GA	9.76	213
R1GT	9.17	200
R1GC	7.39	161

Tal como se muestra en la tabla 13, en referencia a 100 de tasa de conversión de psicosa de R1GG, la tasa de conversión relativa de R1GA era de 213, la de R1GT era de 200, la de R1GC era de 161 y la de R1TT era de 147. Por lo tanto, todos los mutantes mostraron una tasa de conversión incrementada.

7-4: comparación de la estabilidad térmica en la reacción celular

Aparte de la elevada tasa de conversión de las células, las células que convierten la psicosa epimerasa establemente asimismo resultan importantes en el campo industrial. Por lo tanto, el presente experimento se llevó a cabo para confirmar la estabilidad térmica de la célula.

Con el fin de confirmar la estabilidad térmica de la célula a 50°C, se resuspendieron 1.0 mg/ml de células pretratadas con surfactante, en tampón PIPES 50 mM (pH 7.0) y se calentaron a 50°C. Las células se muestrearon cada hora de calentamiento y se utilizaron para la reacción de conversión en la que se añadieron las células muestreadas al sustrato que contenía fructosa al 50% y Mn²⁺ 1 mM y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60 minutos.

La tasa de conversión de psicosa y la medida decreciente de las células muestreadas se muestran en la tabla 14 mediante referencia al cero de tasa de conversión y al cero de tiempo de calentamiento.

[Tabla 14]

Minutos de reacción	pCES_sodCII	R1GA	R1GT	R1GC	R1GG
0	100	100	100	100	100
240	86.6	82.3	83.9	91	83.8

Minutos de reacción	pCES_sodCII	R1GA	R1GT	R1GC	R1GG
360	83.5	77.7	74.1	84.8	79.2
840	77.9	76.6	72.3	84.7	78.1
1200	73.2	75.8	73.2	81.9	64.2
1560	70.4	70.1	66.9	77.6	62.3
1680	67.9	66.7	65.2	73.8	56.1
1740	62.3	58.7	56.2	52.4	55.3

Ejemplo 8: producción de secuencia reguladora modificada y expresión de CDPE

8-1: producción de vector que incluye una secuencia reguladora modificada

Como resultado de la secuencia modificada según la mutagénesis de saturación, TT situado en el primer espaciador después del primer RBS afectó a la expresión de CDPE. De esta manera, TT situado en el primer espaciador después del primer RBS se sustituyó por GT, GC o GG; se sometió a ensayo para la expresión de CDPE y se seleccionó como R1-1/GA en sustitución de TT después del primer RBS). Se utilizó la secuencia de nucleótidos de R1-1 como molde para sustituir TT después del segundo RBS por GA, GT, GC o GG. Los mutantes se sometieron a ensayo para la tasa de conversión de psicosa.

Se produjeron los dobles mutantes mediante la utilización del mutante (R1-1) obtenido en el ejemplo 5 como molde y el cebador siguiente en la tabla 15.

[Tabla 15]

Cebador	secuencia (5' -> 3')	SEC ID nº
RBS1GA/RBS2GA_F	GACTACGCATACGACGAAAGGAGAACAAAATGAA ACACGGTATCTACTAC	55
RBS1GA/RBS2GA_R	GTAGTAGATACCGTGTTTCATTTTGTTCCTTTTC GTCGTATGCGTAGTC	56
RBS1GA/RBS2GT_F	GACTACGCATACGACGAAAGGAGTACAAAATGAA ACACGGTATCTACTAC	57
RBS1GA/RBS2GT_R	GTAGTAGATACCGTGTTTCATTTTGTACTCCTTTTC GTCGTATGCGTAGTC	58
RBS1GA/RBS2GC_F	GACTACGCATACGACGAAAGGAGCACAAAATGAA ACACGGTATCTACTAC	59
RBS1GA/RBS2GC_R	GTAGTAGATACCGTGTTTCATTTTGTGCTCCTTTTC GTCGTATGCGTAGTC	60
RBS1GA/RBS2GG_F	GACTACGCATACGACGAAAGGAGGACAAAATGAA ACACGGTATCTACTAC	61
RBS1GA/RBS2GG_R	GTAGTAGATACCGTGTTTCATTTTGTCTCCTTTTC GTCGTATGCGTAGTC	62

8-2: medición de la tasa de expresión de CDPE

Según el mismo método del ejemplo 7-2, se transformó *Corynebacterium glutaricum* con el plásmido que incluía la secuencia reguladora modificada. Se determinó la tasa de conversión de CDPE y se indica en la tabla 16.

Tal como se muestra en la tabla 13, proteínas celulares completas se refieren a todas las proteínas dentro de la célula que expresan psicosa epimerasa celular y la cantidad de psicosa epimerasa se refiere a la cantidad de psicosa epimerasa purificada. Por lo tanto, la tasa de conversión se refiere al valor calculado que muestra la proporción de proteína diana expresada respecto a las proteínas celulares totales.

[Tabla 16]

microorganismo	proteínas celulares completas (mg)	enzima psicosa epimerasa (mg)	tasa de conversión (%)
pCES_sodCII	10.7	1.1	10.3
R1GA/R2GA	10.3	1.5	14.5
R1GA/R2GT	10.7	1.6	15.0
R1GA/R2GC	12.8	1.8	14.1
R1GA/R2GG	11.9	1.7	14.3

Tal como se muestra en la tabla 16, las dobles mutaciones de R1GA/R2GA, R1GA/R2GT, R1GA/R2GC y

R1GA/R2GG muestran una tasa de conversión incrementada de CDPE respecto a la de pCES_sodCDPE.

8-3: producción de psicosa mediante la utilización de la reacción celular

5 Según el mismo método del ejemplo 8-2, se transformó *Corynebacterium glutaricum* con el plásmido que incluía la secuencia reguladora modificada, y se cultivó en 100 ml de medio LB. Se determinó la tasa de conversión de CDPE mediante la reacción celular y se indica en la tabla 17.

10 Con el fin de identificar el producto, se obtuvo la tasa de conversión mediante el análisis del pico de CL del sustrato (fructosa) y del producto (psicosa) y la superficie del pico. Como resultado, se analizó la tasa de producción inicial de psicosa (unidades/g-DCW) mediante la utilización de diversas soluciones de surfactante y se indican en la tabla 17.

15 El análisis de CL se llevó a cabo mediante la utilización del detector de índice de refracción (Agilent 1260 RID) de HPLC (Agilent, EE.UU.) dotado de una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD), agua a 80°C como fase móvil y un caudal de columna de 0.6 ml/min.

[Tabla 17]

Muestra	Tasa de conversión de psicosa (%)	Tasa de conversión relativa (%)
R1GG	4.58	100
R1GA/R2GC	9.95	217

20 Tal como se muestra en la tabla 17, la tasa de conversión relativa (%) de la doble mutación R1GA/R2GC mostró un valor de 217 respecto a la base de 100 de la tasa de conversión de psicosa de R1GG.

8-4: comparación de la estabilidad térmica en la reacción celular

25 Aparte de la elevada tasa de conversión de la célula, las células que convierten la psicosa epimerasa establemente asimismo resultan importantes en el campo industrial. Por lo tanto, el presente experimento se llevó a cabo para confirmar la estabilidad térmica de la célula.

30 Con el fin de confirmar la estabilidad térmica de las células a 50°C, se resuspendieron 1.0 mg/ml de células pretratadas con surfactante, en tampón PIPES 50 mM (pH 7.0) y se calentaron a 50°C. Las células se muestrearon cada hora de calentamiento y se utilizaron para la reacción de conversión en la que se añadieron las células muestreadas a sustrato que contenía fructosa al 50% y Mn²⁺ 1 mM y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60 minutos.

35 La tasa de conversión de psicosa y la medida decreciente de las células muestreadas se muestran en la tabla 18 mediante referencia al cero de tasa de conversión y al cero de tiempo de calentamiento.

[Tabla 18]

Tiempos de reacción (minutos)	pCES_sodCII	R1GA/R2GA	R1GA/R2GT	R1GA/R2GC	R1GA/R2GG
0	100	100	100	100	100
240	86.6	86.9	90.8	90.4	88.5
360	83.5	90	81.5	92.2	83.6
840	77.9	80.9	68.4	77.4	82.4
1200	73.2	77.3	64.6	73.6	72.2
1560	70.4	74.1	62.7	70.8	75.4
1680	67.9	70.5	59.6	67.4	71.8
1740	62.3	66.4	56.9	61.7	63.2

40 Tal como se muestra en la tabla 18, mediante comparación de la estabilidad térmica de pCES_sodCDPE y doble mutación, la estabilidad térmica de la doble mutación no era diferente de la de pCES_sodCDPE y, de esta manera, el doble mutante presenta una buena estabilidad térmica. De acuerdo con lo anterior, la secuencia reguladora modificada afecta a la expresión de CDPE pero no influye sobre la estabilidad térmica.

45

Ejemplo 9. Producción de plásmido

Ejemplo 9-1: preparación de vector con promotor *sod*

50 La secuencia de nucleótidos (gen CDPE, GenBank: EDS06411.1) codificante de psicosa epimerasa derivada de *Clostridium scindens* ATCC 35704 se optimizó para *E. coli* a fin de producir una secuencia de nucleótidos modificada, que se denominó CDPE. El polinucleótido optimizado (SEC ID nº 38, la secuencia reguladora *sod*

(SEC ID nº 17: promotor sod-RBS-ESPACIADOR R11T-CONECTOR) derivado de ADN_g de *Corynebacterium* y terminador T7 del vector pET21a se amplificó mediante el método de PCR para producir cada molde y se ligó a un molde siguiendo el método de PCR solapante. El molde se clonó en el vector pGEM T-easy según el método de clonación de vector T y se analizó para la secuencia. Específicamente, el polinucleótido incluía el promotor sod de SEC ID nº 6, la secuencia codificante de CDPE optimizada para *E. coli* de SEC ID nº 38 y el terminador T7.

Se insertó el polinucleótido completo en el mismo sitio de reconocimiento de restricción de pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol. 18:639-647, 2008) con los enzimas de restricción NotI y XbaI (NEB) para producir el vector recombinante de pCES208/psicosa epimerasa (pCES_sodCDPE). El mapa de escisión del vector recombinante (pCES_sodCDPE) se muestra en la figura 1.

Ejemplo 9-2: preparación de vector con promotor *tac1*

Con el fin de comparar la actividad y la expresión de la proteína de interés, así como pCES_sodCDPEII, se preparó el plásmido:

el polinucleótido de CDPE (SEC ID nº 38) derivado de pET21a_CDPE mediante la utilización de PCR se introdujo en los sitios XmaI e HindIII de pKK223-3 para obtener pKK_CDPE. Se obtuvo el polinucleótido que incluía el promotor *tac1* (SEC ID nº 69) hasta el terminador rrn de pKK_CDPE, a modo de molde mediante la utilización de PCR, y se insertó en los sitios NotI y XbaI de pCES208 para producir vector recombinante (pCES_tac1CDPE). El mapa de escisión del vector recombinante (pCES_tac1CDPE) se muestra en la figura 3.

Ejemplo 9-3: preparación de vector con promotor *tac2*

El polinucleótido de CDPE (SEC ID nº 38) derivado de pET21a_CDPE mediante la utilización de PCR se introdujo en los sitios NcoI y SalI de pKD, obteniendo pKD_CDPE. Se obtuvo el polinucleótido que incluía el promotor *tac2* (SEC ID nº 72) hasta el terminador rrn de pKK_CDPE, a modo de molde mediante la utilización de PCR, y se insertó en el sitio XbaI de pCES208 para producir vector recombinante (pCES_tac2CDPE). El mapa de escisión del vector recombinante (pCES_tac2CDPE) se muestra en la figura 4.

Ejemplo 9-4: preparación de vector con promotor *Trc*

El polinucleótido de CDPE (SEC ID nº 38) derivado de pET21a_CDPE mediante la utilización de PCR se introdujo en los sitios XmaI e HindIII de pTrc99a, obteniendo pTrc_CDPE. Se obtuvo el polinucleótido que incluía el promotor *Trc* (SEC ID nº 73) hasta el terminador rrnB de pTrc_CDPE, a modo de molde mediante la utilización de PCR, y se insertó en el sitio XbaI de pCES208 para producir vector recombinante (pCES_TrCDPE). El mapa de escisión del vector recombinante (pCES_TrCDPE) se muestra en la figura 5.

Ejemplo 10. Transformación de células hospedadoras

Se transformó *Corynebacterium glutaricum* con cuatro tipos de plásmido, obtenidos en el EJEMPLO 9 mediante electroforesis, respectivamente. Específicamente, se vertió canamicina en un tubo de 1.5 ml hasta una concentración final de 15 µg/ml y se añadieron 4 ml de medio LB (triptona 10 g/l, NaCl 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l). Las colonias seleccionadas aleatoriamente se inocularon en la placa y se cultivaron a 30°C durante aproximadamente 16 horas a 250 rpm. A continuación, se incubó 1 ml del cultivo celular en 100 ml de medio LB que incluía 15 µg/ml de canamicina durante 16 horas. Específicamente, *Corynebacterium glutaricum* transformado con vector recombinante (pCES_sodCDPE) del ejemplo 9-1 se depositó en el Korea Culture Center of Microorganisms (KCCM), situado en 25, Honggehae-2-Gil, Seodaemun-Gu, Seoul-Si, República de Corea, el 29 de octubre de 2014, y recibió el número de acceso KCCM11593P

Ejemplo 11. Ensayo de expresión de proteínas

Las células en cultivo se lisaron mediante la utilización de un molino de perlas y se obtuvo el sobrenadante. El sobrenadante se mezcló con tampón para muestras en una proporción de mezcla de 1: 1 y se calentó a 100°C durante 5 minutos a fin de obtener la muestra. La muestra preparada se analizó mediante electroforesis con gel de SDS-PAGE al 12% (composición: gel de migración - 3.3 ml de H₂O, 4.0 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de tampón Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 µl de SDS al 10%, 100 µl de APS al 10%, 4 µl de TEMED / gel de carga - 1.4 ml de H₂O, 0.33 ml de acrilamida al 30%, 0.25 ml de tampón Tris 1 M (pH 6.8), 20 µl de SDS al 10%, 20 µl de APS al 10%, 2 µl de TEMED) mediante la utilización de electroforesis a 180V durante 50 minutos a fin de identificar la expresión de las proteínas. Se muestra el resultado del análisis electroforético en la figura 6.

Tras el ensayo de la expresión de CDPE en el gel de SDS-PAGE, la proteína se purificó mediante la utilización de purificación de etiqueta de His con resina de Ni-NTA y se calculó la tasa de expresión mediante la utilización de la fórmula (tasa de expresión (%))=(proteína purificada (mg) / proteínas solubles totales (mg)) * 100) y se muestra en la tabla 19. En la tabla 19, las proteínas totales en la cepa se refieren a las proteínas totales dentro de la cepa de *Corynebacterium* que expresan la psicosa epimerasa; la psicosa epimerasa se obtuvo mediante purificación a

partir de las proteínas totales. De acuerdo con lo anterior, la tasa de expresión se refiere a la proporción de expresión de proteína diana a proteínas totales de la cepa de *Corynebacterium*.

[Tabla 19]

Promotor	Proteínas completas en cepa (mg)	Psicosa epimerasa (mg)	Tasa de expresión (%)
Tac	21.43	6.28	29.3
Tac2	15	2.36	15.73
Trc	17.74	1.68	9.47
SOD	16.62	1.74	10.47

Ejemplo 12. Producción de psicosa mediante la utilización de la reacción celular

Las células mutantes que expresaban CDPE obtenidas en el ejemplo 2 se añadieron al sustrato que contenía fructosa 50 mM con adición de Mn^{2+} 1 mM a una concentración de 0.5 a 2 mg/ml, se hicieron reaccionar a pH 7.0, PIPES 50 mM a 60°C, y después se desactivaron con calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Cada cepa se hizo reaccionar bajo la misma condición de reacción y se muestreó en cada tiempo de reacción, a fin de calcular la velocidad de reacción celular inicial y la cantidad de psicosa producida para cada cepa recombinante. En la región lineal de la tasa de conversión de psicosa, se calculó la velocidad de reacción celular inicial por unidad celular (fórmula: velocidad de reacción celular inicial por unidad celular=cantidad de psicosa producida (g/l) / tiempo (min) / cantidad de células utilizada para la reacción (g)), mostrando el resultado en la tabla 3 y en la figura 7.

Para confirmar el producto, el sustrato (fructosa) y el producto (psicosa) se analizaron cuantitativamente mediante HPLC para identificar el pico y la superficie del pico. Como resultado, se analizaron las tasas iniciales de reacción (unidades/g-DCW) de producción de psicosa según las diversas soluciones de surfactante y se muestran en la tabla 3. El análisis de HPLC se llevó a cabo con un HPLC (Agilent, EE.UU.) dotado de un detector de índice de refracción (Agilent 1260 RID) y una columna Aminex HPX-87C (BIO-RAD). La fase móvil era agua a 80°C, con un caudal de 0.6 ml/min.

Se compararon los resultados finales con la velocidad de reacción inicial. La velocidad de reacción inicial se refiere al valor obtenido mediante la división de la cantidad de producto y la cantidad de células utilizada para la reacción y el tiempo de reacción en el punto de la reacción en la región lineal de la velocidad de reacción. Es decir, a medida que se incrementa la velocidad de reacción inicial, la cantidad de psicosa producida respecto a la misma cantidad de células y el tiempo de reacción se incrementa.

[Tabla 20]

Muestra	Psicosa (g/l)	Velocidad de reacción celular inicial
tacCDPE	59.12	3941
tac2CDPE	58.96	1965
trcCDPE	47.90	798
sodCDPE	65.28	1088

Tal como se muestra en la tabla 20, tacCDPE con la tasa de expresión más elevada mostró la actividad de reacción más elevada, y tac2, sod y Trc mostraron una velocidad de reacción celular reducida. De acuerdo con lo anterior, el resultado confirmó que la velocidad de reacción celular inicial era proporcional a la cantidad de CDPE expresada.

Ejemplo 13: comparación de la estabilidad térmica en la reacción celular

Aunque es importante que la cepa presente una expresión elevada de psicosa, en el campo industrial es más importante que la cepa exprese establemente la psicosa epimerasa. De esta manera, se llevó a cabo el presente experimento para confirmar la estabilidad térmica de expresión de la psicosa epimerasa.

Con el fin de someter a ensayo la estabilidad térmica en la reacción celular a 50°C, la cepa recombinante que expresa CDPE obtenida en el ejemplo 2 se cultivó a 50°C y se calentó y después se utilizó para la reacción celular. Se midió la semivida de cada cepa (min) y se muestra en la tabla 21 y en la figura 8.

[Tabla 21]

Enzima producido	Semivida celular (minutos)
tacCDPE	1300
tac2CDPE	1260
trcCDPE	1500
sodCDPE	1800

- 5 Tal como se muestra en la tabla 21, las células recombinantes de tac/CDPE presentaba la tasa de expresión más alta, aunque la célula recombinante de sod/CDPE mostró la semivida más estable, de 1800 minutos. Aunque la actividad celular resulta importante para la producción de psicosa utilizando la reacción celular, la estabilidad térmica de las células resulta más importante desde el punto de vista económico, con la condición de que la actividad celular cumpla con el nivel óptimo. De esta manera, la cepa recombinante de sod/CDPE puede ser una cepa más preferente en el campo industrial.

<110> SAMYANG GENEX CORPORATION

<120> Sistema de expresión de la psicosa epimerasa y producción de la psicosa que utiliza la misma

5 <130> OPP20153800KR

<160> 75

<170> KopatentIn 2.0

10 <210> 1
<211> 283
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> promotor

<400> 1
aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg 60
aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt 120
attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata 180
tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct 240
20 gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tac 283

<210> 2
<211> 7
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBS

30 <400> 2
gaaagga 7

<210> 3
<211> 10
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> primer espaciador R1TT

40 <400> 3
tttttacc 10

<210> 4
<211> 10
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> primer espaciador RIGA

<400> 4
gattttacc 10

55 <210> 5
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> primer espaciador R1GT

 <400> 5
 5 gtttttacc 10

 <210> 6
 <211> 10
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> primer espaciador R1GC

 <400> 6
 15 gcttttacc 10

 <210> 7
 <211> 7
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> segundo espaciador R2TT
 25
 <400> 7
 ttacaaa 7

 <210> 8
 30 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> segundo espaciador R2GA

 <400> 8
 gaacaaa 7

 <210> 9
 40 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> segundo espaciador R2GT

 <400> 9
 50 gtacaaa 7

 <210> 10
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> segundo espaciador R2GC

 <400> 10
 60 gcacaaa 7

 <210> 11
 <211> 7
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 796 749 T3

<220>
 <223> segundo espaciador R2GG

5 <400> 11
 ggacaaa 7

10 <210> 12
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> primer conector

15 <400> 12
 atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg ac 42

20 <210> 13
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> RBS1/primer espaciador-TT

25 <400> 13
 aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg 60
 aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt 120
 attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata 180
 tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct 240
 gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga ttttttacct 300
 300

30 <210> 14
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> RBS1/primer espaciador-GA

35 <400> 14
 aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg 60
 aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt 120
 attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata 180
 tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct 240
 gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttacct 300
 40 300

45 <210> 15
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> RBS1/primer espaciador-GT

ES 2 796 749 T3

	<400> 15	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
		300
5	<210> 16 <211> 300 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> RBS1/primer espaciador-GC	
	<400> 16	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
		300
15	<210> 17 <211> 342 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> RBS1/primer espaciador-TT/conector	
	<400> 17	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga ttttttacct	300
25	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg ac	342
30	<210> 18 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> R1GA/R2TT	

ES 2 796 749 T3

	<400> 18	
	aagcgctca tcagcggttaa ccatcacggg ttcggtgctg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttaccc	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggat tacaaa	356
5	<210> 19	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> R1GA/R2GA	
	<400> 19	
	aagcgctca tcagcggttaa ccatcacggg ttcggtgctg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttaccc	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag aacaaa	356
15	<210> 20	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> R1GA/R2GT	
	<400> 20	
	aagcgctca tcagcggttaa ccatcacggg ttcggtgctg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttaccc	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag tacaaa	356
25	<210> 21	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> R1GA/R2GC	

ES 2 796 749 T3

	<400> 21	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg tacccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
5	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttaccc	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag cacaaa	356
	<210> 22	
	<211> 356	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> R1GA/R2GG	
	<400> 22	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg tacccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gattttaccc	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag gacaaa	356
15	<210> 23	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> R1GT/R2TT	
	<400> 23	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg tacccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggat tacaaa	356
	<210> 24	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> R1GT/R2GA	
	<400> 24	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg tacccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcg agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggat tacaaa	356
	<210> 24	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> R1GT/R2GA	
	<400> 24	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120

ES 2 796 749 T3

	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgca agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag aacaaa	356
5	<210> 25 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> R1GT/R2GT	
	<400> 25 aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgag aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgca agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag tacaaa	356
15	<210> 26 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> R1GT/R2GC	
	<400> 26 aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgag aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgca agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag cacaaa	356
25	<210> 27 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> R1GT/R2GG	

ES 2 796 749 T3

	<400> 27	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gtttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag gacaaa	356
5	<210> 28 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> R1GC/R2TT	
	<400> 28	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggat taaaaa	356
15	<210> 29 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> R1GC/R2GA	
	<400> 29	
	aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgcg taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag aaaaaa	356
25	<210> 30 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> R1GC/R2GT	

ES 2 796 749 T3

	<400> 30	
	aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag taaaa	356
5	<210> 31	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> R1GC/R2GC	
	<400> 31	
	aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag caaaa	356
15	<210> 32	
	<211> 356	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> R1GC/R2GG	
	<400> 32	
	aagcgctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
	aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
	attccgggct tgtgaccgc taccgataa ataggctggc tgaaaaattt cgttgcaata	180
	tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
25	gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga gcttttacct	300
	atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggag gaaaa	356
30	<210> 33	
	<211> 289	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia de aminoácidos de una proteína enzimática originada a partir de <i>Clostridium scindens</i>	

ES 2 796 749 T3

<400> 33

```

Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr Trp Glu Gln Glu Trp Ala Ala
 1           5           10           15

Asp Tyr Lys Arg Tyr Val Glu Lys Ala Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
      20           25           30

Leu Glu Val Gly Ala Ala Pro Leu Pro Asp Tyr Ser Ala Gln Glu Val
      35           40           45

Lys Glu Leu Lys Lys Cys Ala Asp Asp Asn Gly Ile Gln Leu Thr Ala
      50           55           60

Gly Tyr Gly Pro Ala Phe Asn His Asn Met Gly Ser Ser Asp Pro Lys
      65           70           75           80

Ile Arg Glu Glu Ala Leu Gln Trp Tyr Lys Arg Leu Phe Glu Val Met
      85           90           95

Ala Gly Leu Asp Ile His Leu Ile Gly Gly Ala Leu Tyr Ser Tyr Trp
      100          105          110

Pro Val Asp Phe Ala Thr Ala Asn Lys Glu Glu Asp Trp Lys His Ser
      115          120          125

Val Glu Gly Met Gln Ile Leu Ala Pro Ile Ala Ser Gln Tyr Gly Ile
      130          135          140

Asn Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Ser His Ile Leu Asn
      145          150          155          160

Thr Ser Glu Glu Gly Val Lys Phe Val Thr Glu Val Gly Met Asp Asn
      165          170          175

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

Ile Gly Asp Ala Ile Arg His Ala Gly Lys Leu Leu Gly His Phe His
      195          200          205

Thr Gly Glu Cys Asn Arg Met Val Pro Gly Lys Gly Arg Thr Pro Trp
      210          215          220

Arg Glu Ile Gly Asp Ala Leu Arg Glu Ile Glu Tyr Asp Gly Thr Val
      225          230          235          240

Val Met Glu Pro Phe Val Arg Met Gly Gly Gln Val Gly Ser Asp Ile
      245          250          255

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

Glu Asp Ala Arg Arg Ala Val Glu Phe Gln Arg Tyr Met Leu Glu Trp
      275          280          285

```

Lys

5

<210> 34

<211> 295

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de psicosa 3-epimerasa a partir de *Treponema primitia*

ES 2 796 749 T3

<400> 34

```

Met Gln Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Tyr Trp Thr Lys Glu Trp Gln Ala
 1          5          10          15

Asp Tyr Lys Lys Tyr Ile Asp Lys Val Ser Lys Leu Gly Phe Asp Ile
      20          25          30

Leu Glu Ile Ser Cys Ala Ala Leu Lys Asp Gln Tyr Val Ser Asp Ser
      35          40          45

Gln Leu Phe Asp Leu Arg Asp Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Val Thr Leu
      50          55          60

Thr Ala Gly Tyr Gly Pro Ala Lys Gly Glu Asn Leu Ser Ser Ser Asp
      65          70          75          80

Asn Arg Val Val Lys Asn Ala Lys Ala Phe Tyr Lys Asp Val Leu Gly
      85          90          95

Lys Leu Asn Lys Leu Asp Ile Arg Leu Leu Gly Gly Gly Leu Tyr Ser
      100          105          110

Tyr Trp Pro Val Asp Tyr Ser Leu Pro Ile Asp Lys Ala Gly Asp Trp
      115          120          125

Lys Arg Ser Val Glu Asn Ile Arg Glu Ile Ala Ala Ile Ala Ala Asp
      130          135          140

Arg Asn Val Val Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Gly Tyr
      145          150          155          160

Leu Leu Asn Thr Cys Glu Glu Gly Ile Lys Phe Val Asp Glu Val Asn
      165          170          175

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

Glu Asp Asn Met Ala Glu Ala Ile Arg Met Ala Gly Asp Lys Leu Gly
      195          200          205

His Phe His Ile Gly Glu Gln Asn Arg Lys Val Pro Gly Lys Gly Cys
      210          215          220

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

Gly Thr Val Val Met Glu Pro Phe Val Met Pro Gly Gly Thr Ile Gly
      245          250          255

Gln Asp Ile Lys Val Trp Arg Asn Leu Leu Pro Glu Thr Ser Glu Thr
      260          265          270

Ile Leu Asp Arg Asp Ala Lys Gly Ala Leu Glu Phe Val Lys His Val
      275          280          285

Phe Gly Ser Thr Ser Val Leu
      290          295

```

5

<210> 35

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de D-psicosa 3-epimerasa originada a partir de *Ensifer adhaerens*

ES 2 796 749 T3

<400> 35

```

Met Gln Gly Phe Gly Val His Thr Ser Met Trp Thr Met Asn Trp Asp
 1          5          10          15

Arg Pro Gly Ala Glu Arg Ala Val Ala Ala Val Lys Tyr Ala Val
      20          25          30

Asp Phe Ile Glu Ile Pro Met Leu Asn Pro Pro Ala Val Asp Thr Ala
      35          40          45

His Thr Arg Ala Leu Leu Glu Lys Asn Lys Leu Arg Ala Val Cys Ser
      50          55          60

Leu Gly Leu Pro Glu Arg Ala Trp Ala Ser Val Arg Pro Asp Ala Ala
      65          70          75          80

Ile Glu His Leu Lys Val Ala Ile Asp Lys Thr Ala Asp Leu Gly Gly
      85          90          95

Glu Ala Leu Ser Gly Val Ile Tyr Gly Gly Ile Gly Glu Arg Thr Gly
      100          105          110

Val Pro Pro Thr Glu Ala Glu Tyr Asp Asn Ile Ala Arg Val Leu Gln
      115          120          125

Ala Ala Ala Lys His Ala Lys Thr Arg Gly Ile Glu Leu Gly Val Glu
      130          135          140

Ala Val Asn Arg Tyr Glu Asn His Leu Ile Asn Thr Gly Trp Gln Ala
      145          150          155          160

Val Asp Met Ile Lys Arg Val Gly Ala Asp Asn Val Phe Val His Leu
      165          170          175

Asp Thr Tyr His Met Asn Ile Glu Glu Lys Gly Ile Gly Thr Gly Ile
      180          185          190

Leu Asp Ala Arg Asp Phe Ile Lys Tyr Ile His Leu Ser Glu Ser Asp
      195          200          205

Arg Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Asn Cys Ala Trp Asp Glu Ile Phe Ala
      210          215          220

Thr Leu Ala Ala Ile Gly Phe Lys Gly Gly Leu Ala Met Glu Ser Phe
      225          230          235          240

Ile Asn Met Pro Pro Glu Val Ala Tyr Gly Leu Ala Val Trp Arg Pro
      245          250          255

Val Ala Arg Asp Glu Glu Glu Val Met Gly Asn Gly Leu Pro Phe Leu
      260          265          270

Arg Asn Lys Ala Arg Gln Tyr Gly Leu Ile
      275          280

```

5

<210> 36

<211> 290

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de D-psicosa 3-epimerasa originada a partir de *Ruminococcus torques*

ES 2 796 749 T3

<400> 36

```

Met Lys Met Lys Phe Gly Thr Leu Tyr Ser Tyr Trp Gly Thr Lys Trp
 1          5          10          15

Gln Cys Asp Tyr Leu Lys Thr Leu Lys Arg Val Ser Asp Ile Gly Phe
      20          25          30

Asp Ile Leu Glu Met Gly Ala Pro His Leu Leu Glu Met Ser Asp Tyr
      35          40          45

Glu Leu Ser Glu Leu Arg Arg Ala Ala Lys Asp Met Asp Met Val Leu
      50          55          60

Thr Ala Asn Ile Gly Pro Ala Lys Asp Lys Asp Leu Ala Ser Pro Asp
      65          70          75          80

Pro Asp Ile Arg Lys Ala Gly Val Asn Tyr Leu Ile Asp Ile Leu Lys
      85          90          95

Ala Met Glu Lys Val Gly Ser Lys Ser Leu Val Gly Ala Met Tyr Ser
      100          105          110

Tyr Trp Pro Cys Gln Phe Glu Ile Thr Asp Lys Glu Ala Ala Trp Glu
      115          120          125

Arg Ser Ile Glu Gly Met Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Glu Ser Leu
      130          135          140

Gly Ile Glu Cys Cys Gln Glu Val Leu Asn Arg Tyr Glu Thr Tyr Ile
      145          150          155          160

Ile Thr Asp Cys Arg Glu Gly Leu Glu Tyr Cys Arg Arg Val Gly Ser
      165          170          175

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

Asp Asn Ile Pro Glu Ala Ile Arg Leu Ala Gly Arg Lys Leu Gly His
      195          200          205

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

Pro Trp Arg Asp Ile Gly Arg Ala Leu Arg Asp Ile Gly Tyr Glu Lys
      225          230          235          240

Gly Val Val Met Glu Pro Phe Leu Leu Gln Gly Gly Glu Val Ala Arg
      245          250          255

Asp Cys Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Asn Ala Asp Glu Lys Met
      260          265          270

Leu Asp Arg Tyr Ile Lys Glu Ser Leu Thr Phe Leu Lys His Glu Phe
      275          280          285

Thr Phe
      290

```

5

<210> 37

<211> 870

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico modificada (1) de la proteína enzimática de SEC ID nº 33

ES 2 796 749 T3

<400> 37
atgaaacacg gtatctacta cgcgtactgg gaacaggaat gggcggcgga ctacaaacgt 60
tacgttgaaa aagcggcgaa actgggtttc gacatcctgg aagttggtgc ggcgccgctg 120
ccggactact ctgcgcagga agttaaagaa ctgaaaaaat gcgcggacga caacggtatc 180
cagctgaccg cgggttacgg tccggcggtc aaccacaaca tgggttcttc tgacccgaaa 240
atccgtgaag aagcgcgtga gtggtacaaa cgtctgttcg aagttatggc gggctctggac 300
atccacctga tcgggtggtc gctgtactct tactggccgg ttgacttcgc gaccgcgaac 360
aaagaagaag actggaacaa ctctgttgaa ggtatgcaga tcctggcgcc gatcgcgtct 420
cagtacggta tcaacctggg tatggaagtt ctgaaccggt tcgaatctca catcctgaac 480
acctctgaag aaggtgttaa attcgttacc gaagttggta tggacaacgt taaagttatg 540
ctggacacct tccacatgaa catcgaagaa tcttctatcg gtgacgcgat ccgtcacgcg 600
ggtaaacctgc tgggtcactt ccacaccggt gaatgcaacc gtatgggtcc gggtaaagg 660
cgtaccccggt ggcgtgaaat cggtgacgcg ctgcgtgaaa tcgaatacga cggtagcggt 720
gttatggaac cgttcgttcg tatgggtggg caggttgggt ctgacatcaa agtttggcgt 780
gacatctcta aaggtgcggg tgaagaccgt ctggacgaag acgcgcgtcg tgcggttgaa 840
ttccagcggt acatgctgga atggaataa 870

5

<210> 38
<211> 870
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> secuencia de ácido nucleico modificada (2) de la proteína enzimática de SEC ID N° 33

<400> 38
atgaagcacg gcatctacta cgcatactgg gagcaggagt gggcagcaga ctacaagcgc 60
tacgttgaga aggcagcaaa gctgggcttc gacatcctgg aggttggcgc agcaccactg 120
ccagactact ccgcacagga ggttaaggag ctgaagaagt gcgcagacga caacggcatc 180
cagctgaccg caggctacgg cccagcatc aaccacaaca tgggctcctc cgacccaaag 240
atccgcgagg aggcactgca gtggtacaa cgcctgttcg aggttatggc aggcctggac 300
atccacctga tcggcggcgc actgtactcc tactggccag ttgacttcgc aaccgcaaac 360
aaggaggagg actggaagca ctccgttgag ggcattgcaga tcctggcacc aatcgcatcc 420
cagtacggca tcaacctggg catggagggt ctgaaccgct tcgagtccca catcctgaac 480
acctccgagg agggcggtta gttcgttacc gaggttggca tggacaacgt taaggttatg 540
ctggacacct tccacatgaa catcgaggag tcctccatcg gcgacgcaat ccgccacgca 600
ggcaagctgc tgggccactt ccacaccggc gaggcgaacc gcatgggtcc aggcaagggc 660
cgcaccccat ggcgcgagat cggcgacgca ctgcgcgaga tcgagtacga cggcaccggt 720
gttatggagc cattcgttcg catgggcggc caggttgggt ccgacatcaa ggtttggcgc 780
gacatctcca agggcgcagg cgaggaccgc ctggacgagg acgcacgccg cgcagttgag 840
ttccagcgct acatgctgga gtggaagtaa 870

15

ES 2 796 749 T3

<210> 39
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico modificada (1) de la proteína enzimática de SEC ID N° 34

<400> 39
 atgcagtagc gtatctactt cgcgtactgg accaaagaat ggcaggcgga ctacaaaaaa 60
 tacatcgaca aagtttctaa actgggtttc gacatcctgg aaatctcttg cgcggcgctg 120
 10 aaagaccagt acgtttctga ctctcagctg ttcgacctgc gtgactacgc gaaagaaaaa 180
 ggtgttacct tgaccgcggg ttacgggtccg gcgaaagggtg aaaacctgtc ttcttctgac 240
 aaccgtgttg ttaaaaacgc gaaagcgttc tacaagacgc ttctgggtta actgaacaaa 300
 ctggacatcc gtctgctggg tgggtgtctg tactcttact ggccgggttg ctactctctg 360
 ccgatcgaca aagcgggtga ctggaaacgt tctgttgaaa acatccgtga aatcgcggcg 420
 atcgcggcgg accgtaacgt tgttctgggt atggaagttc tgaaccgttt cgaagggttac 480
 ctgctgaaca cctgcgaaga aggtatcaaa ttcgttgacg aagttaacca cccgaacgtt 540
 aaagttatgc tggacacctt ccacatgaac atcgaagaag acaacatggc ggaagcgatc 600
 cgtatggcgg gtgacaaaact gggtcacttc cacatcgggtg aacagaaccg taaagttccg 660
 ggtaaagggt gcatcccgtg gaacgaaatc ggtcacgcgc tgcgtgacat ccgttacaac 720
 ggtaccgttg ttatggaacc gttcgttatg ccgggtggta ccatcgggtca ggacatcaaa 780
 gtttggcgtg acctgctgcc ggaaacctct gaaaccatcc tggaccgtga cgcgaaagggt 840
 gcgctggaat tcgttaaaca cgttttcggt tctacctctg ttctgtaa 888

15

<210> 40
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico modificada (2) de la proteína enzimática de SEC ID N° 34

ES 2 796 749 T3

	<400> 40	
	atgcagtagc gcatctactt cgcatactgg accaaggagt ggcaggcaga ctacaagaag	60
	tacatcgaca aggtttccaa gctgggcttc gacatcctgg agatctcctg cgcagcactg	120
	aaggaccagt acgtttccga ctcccagctg ttcgacctgc gcgactacgc aaaggagaag	180
	ggcgttacct tgaccgcagg ctacggccca gcaaagggcg agaacctgtc ctccctccgac	240
	aaccgcgttg ttaagaacgc aaaggcattc tacaaggacg ttctgggcaa gctgaacaag	300
	ctggacatcc gcctgctggg cggcggcctg tactcctact ggccagttga ctactccctg	360
	ccaatcgaca aggcaggcga ctggaagcgc tccgttgaga acatccgcga gatcgacgca	420
	atcgacgacg accgcaacgt tgttctgggc atggagggtc tgaaccgctt cgagggtac	480
	ctgctgaaca cctgcgagga gggcatcaag ttcgttgacg aggttaacca cccaaacgtt	540
	aaggttatgc tggacacctt ccacatgaac atcgaggagg acaacatggc agaggcaatc	600
	cgcattggcg gcgacaagct gggccacttc caccatggcg agcagaaccg caaggttcca	660
	ggcaagggct gcatcccatg gaacgagatc ggccacgcac tgcgcgacat ccgctacaac	720
	ggcaccgttg ttatggagcc attcgttatg ccaggcggca ccatcgcca ggacatcaag	780
	gtttggcgcg acctgctgcc agagacctcc gagaccatcc tggaccgcga cgcaaagggc	840
5	gcactggagt tcgttaagca cgttttcggc tccacctccg ttctgtaa	888
	<210> 41	
	<211> 855	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> secuencia de ácido nucleico modificada (1) de la proteína enzimática de SEC ID N° 35	
	<400> 41	
	atgcagggtt tcggtgttca cacctctatg tggaccatga actgggaccg tccgggtgcg	60
	gaacgtgcgg ttgcggcggc ggttaaatac gcggttgact tcatcgaaat cccgatgctg	120
	aaccgcggcg cggttgacac cgcgcacacc cgtgcgctgc tggaaaaaaa caaactgcgt	180
	gcggtttgct ctctgggtct gccggaacgt gcgtgggctg ctgttcgtcc ggacgcggcg	240
	atcgaacacc tgaaggttgc gatcgacaaa accgcggacc tgggtggtga agcgtgtct	300
	ggtgttatct acggtggtat cgggtgaacgt accggtgttc cgccgaccga agcgggaatac	360
	gacaacatcg cgcgtgttct gcaggcggcg gcgaaacacg cgaaaaccg tggatcgaa	420
	ctgggtgttg aagcgggtta ccgttacgaa aaccacctga tcaacaccg ttggcaggcg	480
	gttgacatga tcaaacgtgt tggcgcggac aacgttttcg ttcacctgga cacctaccac	540
	atgaacatcg aagaaaaagg tatcggtacc ggtatcctgg acgcgcgtga cttcatcaaa	600
	tacatccacc tgtctgaatc tgaccgtggt accccgggtt acggttaactg cgcgtgggac	660
	gaaatcttcg cgaccctggc ggcgatcggt ttcaaagggt gtctggcgat ggaatctttc	720
	atcaacatgc cgcgggaagt tgcgtacggt ctggcgggtt ggctccggt tgcgcgtgac	780
	gaagaagaag ttatgggtta ctctctgccg ttcctgcgta acaaagcgcg tcagtacggt	840
15	ctgatcctgg aataa	855

ES 2 796 749 T3

<210> 42
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico modificada (2) de la proteína enzimática de SEC ID N° 35

<400> 42
 atgcagggct tcggcggttca cacctccatg tggaccatga actgggaccg cccaggcgca 60
 gagcgcgagcag ttgcagcagc agttaagtac gcagttgact tcatcgagat cccaatgctg 120
 10 aaccaccag cagttgacac cgcacacacc cgcgcactgc tggagaagaa caagctgcgc 180
 gcagtttgct ccctgggcct gccagagcgc gcatgggcat ccgttcgccc agacgcagca 240
 atcgagcacc tgaaggttgc aatcgacaag accgcagacc tgggcggcga ggcactgtcc 300
 ggcgttatct acggcgggcat cggcgagcgc accggcggtc caccaaccga ggcagagtac 360
 gacaacatcg cacgcgttct gcaggcagca gcaaagcacg caaagaccg cgcatcgag 420
 ctgggcgttg aggcagttaa ccgctacgag aaccacctga tcaacaccg ctggcaggca 480
 gttgacatga tcaagcgcgt tggcgagac aacgttttcg ttcacctgga cacctaccac 540
 atgaacatcg aggagaagg catcggcacc ggcacctgg acgcacgcga cttcatcaag 600
 tacatccacc tgtccgagtc cgaccgcgcg accccaggct acggcaactg cgcatgggac 660
 gagatcttgc caaccctggc agcaatcggc ttcaagggcg gcctggcaat ggagtccttc 720
 atcaacatgc caccagaggt tgcatacggc ctggcagttt ggcgcccagt tgcacgcgac 780
 gaggaggagg ttatgggcaa ctccctgcca ttctgcgca acaaggcacg ccagtacggc 840
 ctgatcctgg agtaa 855

<210> 43
 <211> 873
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico modificada (1) de la proteína enzimática de SEC ID N° 36

20

ES 2 796 749 T3

<400> 43
 atgaaaaatga aattcgggtac cctgtactct tactggggta ccaaattggca gtgcgactac 60
 ctgaaaaacc tgaacagtgt ttctgacatc ggtttcgaca tcctggaaat ggggtgcgccg 120
 cacctgctgg aaatgtctga ctacgaactg tctgaactgc gtcgtgcggc gaaagacatg 180
 gacatggttc tgaccgcgaa catcgggtccg gcgaaagaca aagacctggc gtctccggac 240
 ccggacatcc gtaaagcggg tgttaactac ctgatcgaca tcctgaaagc gatggaaaaa 300
 gttggttcta aatctctggt tgggtcgatg tactcttact ggccgtgccca gttcgaaatc 360
 accgacaaaag aagcggcgtg ggaacgttct atcgaaggta tgaaagaagt tgcggaagcg 420
 gcggaatctc tgggtatcga atgctgccag gaagttctga accgttacga aacctacatc 480
 atcaccgact gccgtgaagg tctggaatac tgccgtcgtg ttggttctga aaacgttaac 540
 ctgctgctgg acaccttcca catgaacatc gaagaagaca acatcccga agcgatccgt 600
 ctggcgggtc gtaaactggg tcacctgcac gttggtgaat ctaaccgtaa actgccgggt 660
 atgggttctc tgccgtggcg tgacatcggc cgtgcgctgc gtgacatcgg ttacgaaaaa 720
 ggtgtgttta tggaaccgtt cctgctgcag ggtggtgaag ttgcgcgtga ctgcaaagtt 780
 tggcgtgacc tgtctggtaa cgcggacgaa aaaatgctgg accgttacat caaagaatct 840
 ctgaccttcc tgaaacacga attcaccttc tga 873

5

<210> 44
 <211> 873
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico modificada (2) de la proteína enzimática de SEC ID N° 36

<400> 44
 atgaagatga aatttggaaac attatatctt tattggggaa caaaatggca atgtgattat 60
 ttgaaaacat taaaacgagt ttcagacatc ggatttgaca ttttggaaat ggggtgctcct 120
 cacttggttg aaatgtcaga ttatgaactt tcagaattga ggccgcgcggc gaaagatatg 180
 gatatggtat tgacggcaaa tatcggaccg gcaaaagata aagatcttgc ttctcctgat 240
 ccggatatac gaaaagcggg agtaaaactat ttgatcgata tattaagagc aatggaaaaa 300
 gtaggatcta aatcacttgt tggagcaatg tattcttatt ggccgtgtca atttgaaata 360
 acggataagg aagctgcctg ggagagaagc atcgagggga tgaaagaggt tgcagaagct 420
 gcggaatcat tgggaatcga atgctgtcag gaagttttga atcgatatga aacttatatt 480
 atcacagatt gcagggaagg attggaatac tgcaggagag tcggaagtga aaacgttaat 540
 ctcttctctg atacatttca tatgaatata gaagaagata atattccgga ggctatccgg 600
 cttgcaggaa gaaaattggg ccatctgcat gtgggagaat caaacagaaa gcttccggga 660
 atgggatccc ttcttggag agatatcgga cgggcgctaa gagatatcgg atatgagaaa 720
 ggcgtcgtta tggaaccgtt tcttcttcaa ggagagaggg tcgctcggga ctgtaaagtg 780
 tggagagatt taagtgggaa tgcagatgag aaaatgctgg atcgctatat aaaagaatct 840
 ttaacatttt tgaaacatga atttacgttt tga 873

15

<210> 45
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> RBS1_F
 <400> 45
 10 ggtgcggaag cctacgaaag gannttttac ccatggctgt atacgaac 48
 <210> 46
 <211> 48
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1_R
 20 <400> 46
 gttcgatatac agccatgggt aaaanctct ttcgtagggt tccgcacc 48
 <210> 47
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS2_F
 30 <400> 47
 gactacgcat acgacgaaag gannacaaaa tgaaacacgg tatctactac 50
 <210> 48
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> RBS2_R
 <400> 48
 gtagtagata ccgtgttca tttgtnttc cttcgtcgt atgcgtatgc 50
 <210> 49
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> RBS1GT_F
 <400> 49
 55 ggtgcggaag cctacgaaag gagtttttac ccatggctgt atacgaac 48
 <210> 50
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> RBS1GT_R
 <400> 50
 65 gttcgatatac agccatgggt aaaaactct ttcgtagggt tccgcacc 48

<210> 51
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> RBS1GC_F
 <400> 51
 10 ggtgcgaaa cctacgaaag gagcttttac ccatggctgt atacgaac 48
 <210> 52
 <211> 48
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GC_R
 20 <400> 52
 gttcgtatac agccatgggt aaaagctcct ttcgtaggt tccgcacc 48
 <210> 53
 <211> 48
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GG_F
 30 <400> 53
 ggtgcgaaa cctacgaaag gaggttttac ccatggctgt atacgaac 48
 <210> 54
 <211> 48
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> RBS1GG_R
 <400> 54
 gttcgtatac agccatgggt aaaacctcct ttcgtaggt tccgcacc 48
 45 <210> 55
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GA_F
 <400> 55
 55 gactacgcat acgacgaaag gagaacaaaa tgaaacacgg tatctactac 50
 <210> 56
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GA_R
 <400> 56
 65 gtagtagata ccgtgttca tttgttctc ctttcgtcgt atgcgtagtc 50

<210> 57
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GT_F
 <400> 57
 10 gactacgcat acgacgaaag gagtacaaaa tgaaacacgg tatctactac 50
 <210> 58
 <211> 50
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GT_R
 20 <400> 58
 gtagtagata ccgtgtttca tttgtactc ctttcgtcgt atgcgtagtc 50
 <210> 59
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GC_F
 30 <400> 59
 gactacgcat acgacgaaag gagcacaaaa tgaaacacgg tatctactac 50
 <210> 60
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GC_R
 40 <400> 60
 gtagtagata ccgtgtttca tttgtgctc ctttcgtcgt atgcgtagtc 50
 <210> 61
 <211> 50
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GG_F
 50 <400> 61
 gactacgcat acgacgaaag gaggacaaaa tgaaacacgg tatctactac 50
 <210> 62
 <211> 50
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> RBS1GA/RBS2GG_R
 <400> 62
 65 gtagtagata ccgtgtttca tttgtcctc ctttcgtcgt atgcgtagtc 50

<210> 63
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> promotor tac1 (1)
 <400> 63
 10 tgacaattaa tcatcggctc gtataatgt 29
 <210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> promotor tac2 (1)
 20 <400> 64
 tgacaattaa tcatcggctc cgtataatgt 30
 <210> 65
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> promotor trc (1)
 30 <400> 65
 tgacaattaa tcatcggctc gtataatgt 29
 <210> 66
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> segundo conector
 <400> 66
 gtggaattgt gagcggataa caattcaca caggaaacag aattccggg 50
 45 <210> 67
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> tercer conector
 <400> 67
 taacaatttg tggaattgtg agcggacaca caggaaacag accatggaat tcgagctcgg 60
 taccggg 68
 55 <210> 68
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cuarto conector

	<400> 68		
	gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag acccatgg	48	
5	<210> 69		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Tac1/RBS		
	<400> 69		
	tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg aaagga	36	
15	<210> 70		
	<211> 86		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Tac1/conector/RBS		
	<400> 70		
	tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac	60	
25	aggaaacaga attccccggg aaagga	86	
	<210> 71		
	<211> 93		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Tac1/conector/RBS/espaciador		
	<400> 71		
	tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac	60	
35	aggaaacaga attccccggg aaaggagaac aaa	93	
	<210> 72		
	<211> 37		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Tac2/RBS		
45	<400> 72		
	tgacaattaa tcatcggctc cgtataatgt gaaagga	37	
	<210> 73		
	<211> 87		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Tac2/conector/RBS		
55	<400> 73		
	tgacaattaa tcatcggctc cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	60	
	caggaaacag aattccccggg gaaagga	87	
	<210> 74		
60	<211> 94		

ES 2 796 749 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Tac2/conector/RBS/espaciador

 <400> 74
 tgacaattaa tcatccggct cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 60

 caggaaacag aattcccggg gaaaggagaa caaa 94

 10 <210> 75
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Trc/conector

 <400> 75
 tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 60

 aggaaacaga cccatgg 77
 20

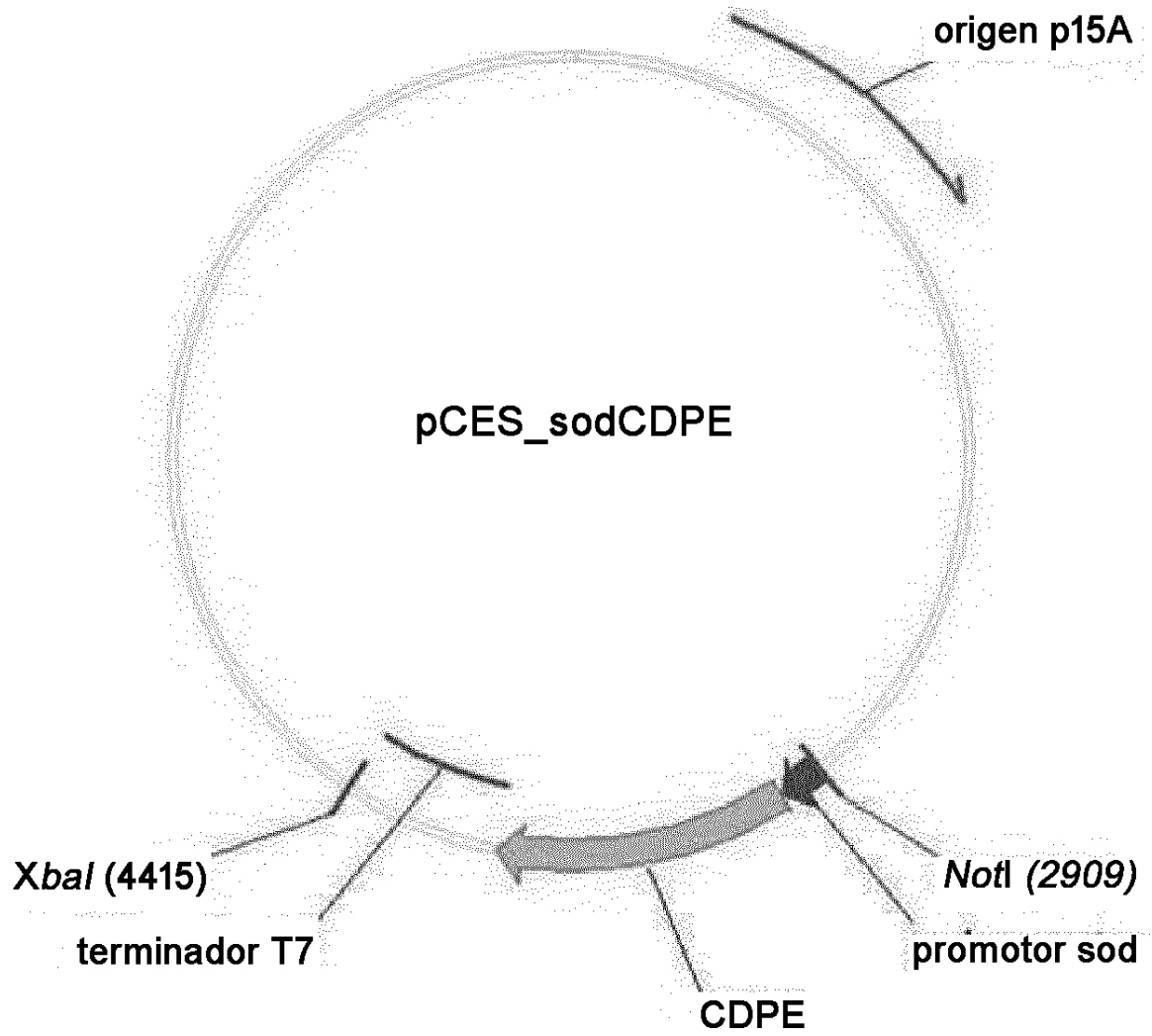
REIVINDICACIONES

1. Casete de expresión génica, que produce una psicosa epimerasa en *Corynebacterium* sp., y que comprende:
 - 5 una secuencia de nucleótidos que codifica la psicosa epimerasa; y una secuencia reguladora que está conectada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos en dirección 5' y que regula la expresión de la secuencia de nucleótidos en *Corynebacterium* sp.,
 - 10 en el que la secuencia reguladora comprende un promotor que incluye una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, una secuencia de primer sitio de unión de ribosoma (RBS) que incluye una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 2, y un primer espaciador que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos de SEC ID nº 4 a SEC ID nº 6.
- 15 2. Casete de expresión génica según la reivindicación 1, en el que la secuencia reguladora comprende además una secuencia de segundo RBS que está conectada con el extremo 3' del primer espaciador directamente o mediante una secuencia de conector y que incluye una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 2.
- 20 3. Casete de expresión génica según la reivindicación 2, en el que la secuencia de primer espaciador incluye la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 4, y en el que la secuencia reguladora comprende además una secuencia de segundo espaciador seleccionada de entre el grupo de las secuencias de nucleótidos de SEC ID nº 7 a SEC ID nº 11.
- 25 4. Casete de expresión génica según la reivindicación 1, en el que la secuencia reguladora comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de SEC ID nº 14 a SEC ID nº 16.
- 30 5. Casete de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el conector comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 12.
- 35 6. Casete de expresión génica según la reivindicación 3, en el que la secuencia reguladora comprende:
 - la secuencia de nucleótidos de promotor de SEC ID nº 1,
 - la secuencia de nucleótidos de RBS de SEC ID nº 2,
 - la secuencia de primer espaciador de SEC ID nº 4,
 - la secuencia de nucleótidos de RBS de SEC ID nº 2, y
 - 40 la secuencia de segundo espaciador seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de SEC ID nº 7 a SEC ID nº 11.
- 45 7. Casete de expresión génica según la reivindicación 1, en el que la *Corynebacterium* sp. es por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* y *Corynebacterium efficiens*.
- 50 8. Casete de expresión génica según la reivindicación 1, en el que la psicosa epimerasa deriva de *Clostridium scidens*, *Treponema primitia*, *Ensifer adhaerens* o *Ruminococcus torques*.
- 55 9. Casete de expresión génica según la reivindicación 8, en el que la psicosa epimerasa es una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en los nucleótidos de SEC ID nº 33 a SEC ID nº 36.
10. Casete de expresión génica según la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la psicosa epimerasa es una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en los nucleótidos de SEC ID nº 37 a SEC ID nº 44.
- 60 11. Vector que comprende un casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Célula hospedadora de *Corynebacterium* sp. recombinante que comprende un casete de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o que es transformada por un vector que comprende un casete de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 65 13. Utilización de una composición que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una célula de *Corynebacterium* sp. recombinante, un cultivo de la célula de *Corynebacterium* sp. recombinante, un lisado de la célula de *Corynebacterium* sp. recombinante y un extracto de dicho cultivo celular o dicho lisado

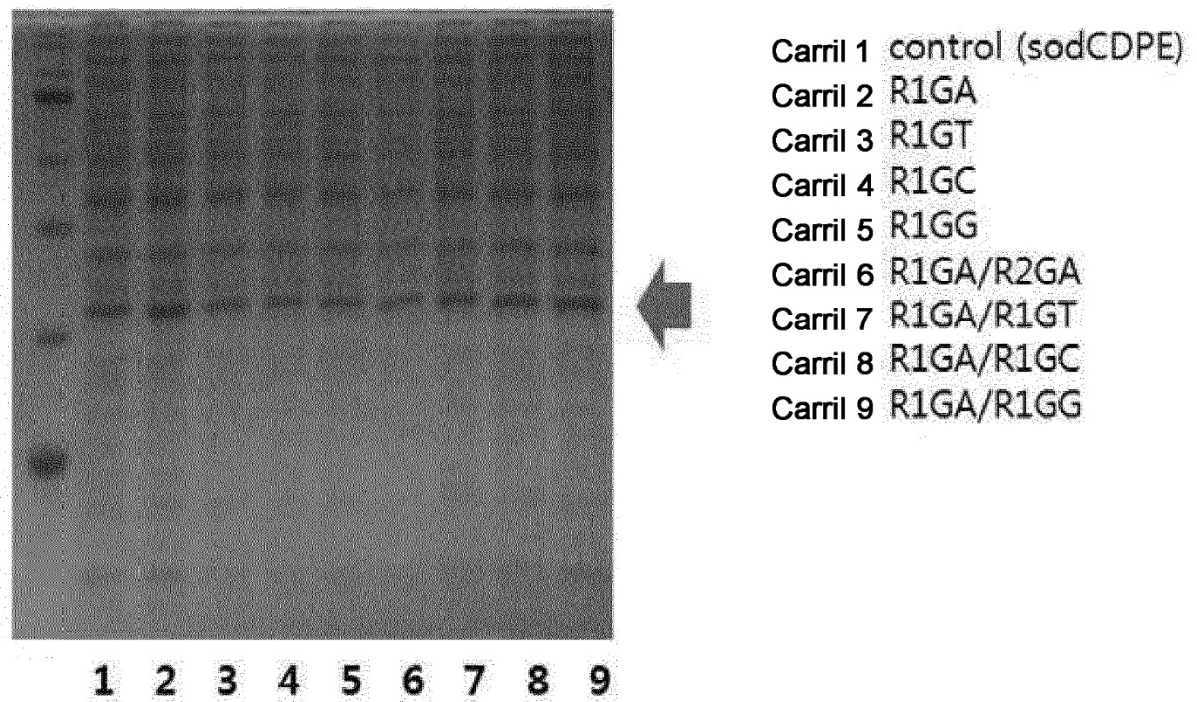
celular, en la que la célula de *Corynebacterium* sp. recombinante incluye un casete de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un vector según la reivindicación 11 para producir una psicosa epimerasa y/o psicosa.

- 5 14. Método para producir una psicosa, que comprende:
 - cultivar una célula de *Corynebacterium* sp. recombinante transformada por un vector que comprende un casete de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y
- 10 hacer reaccionar un sustrato que contiene fructosa con por lo menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en una psicosa epimerasa obtenida del cultivo de *Corynebacterium* sp. recombinante, una célula recombinante, un cultivo de la célula recombinante, un lisado de la célula recombinante y un extracto de cultivo celular o el lisado celular.
- 15 15. Método según la reivindicación 14, en el que el método se lleva a cabo bajo la condición de pH 6 a 9 y temperatura de 40 a 80°C.

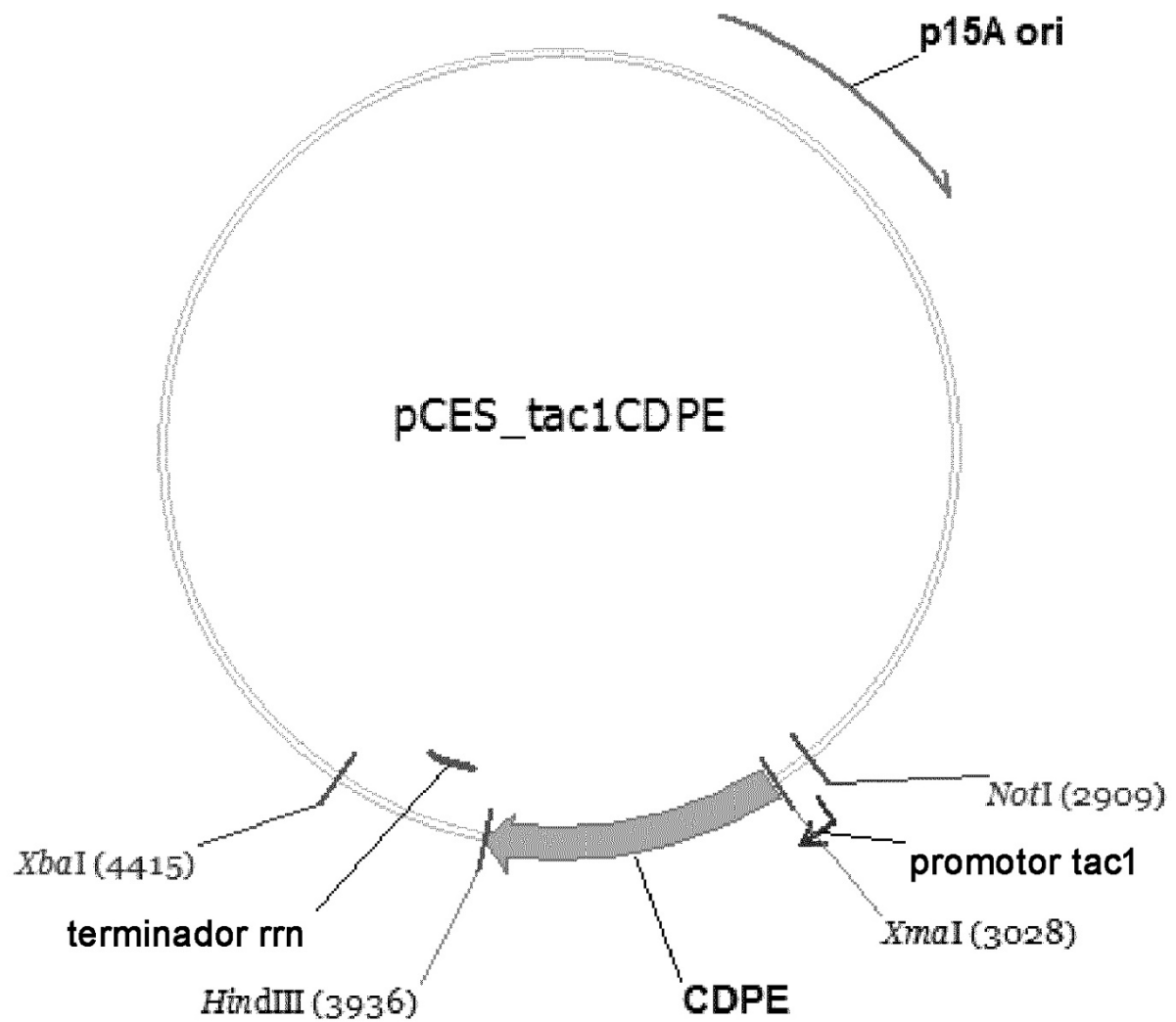
【FIG. 1】



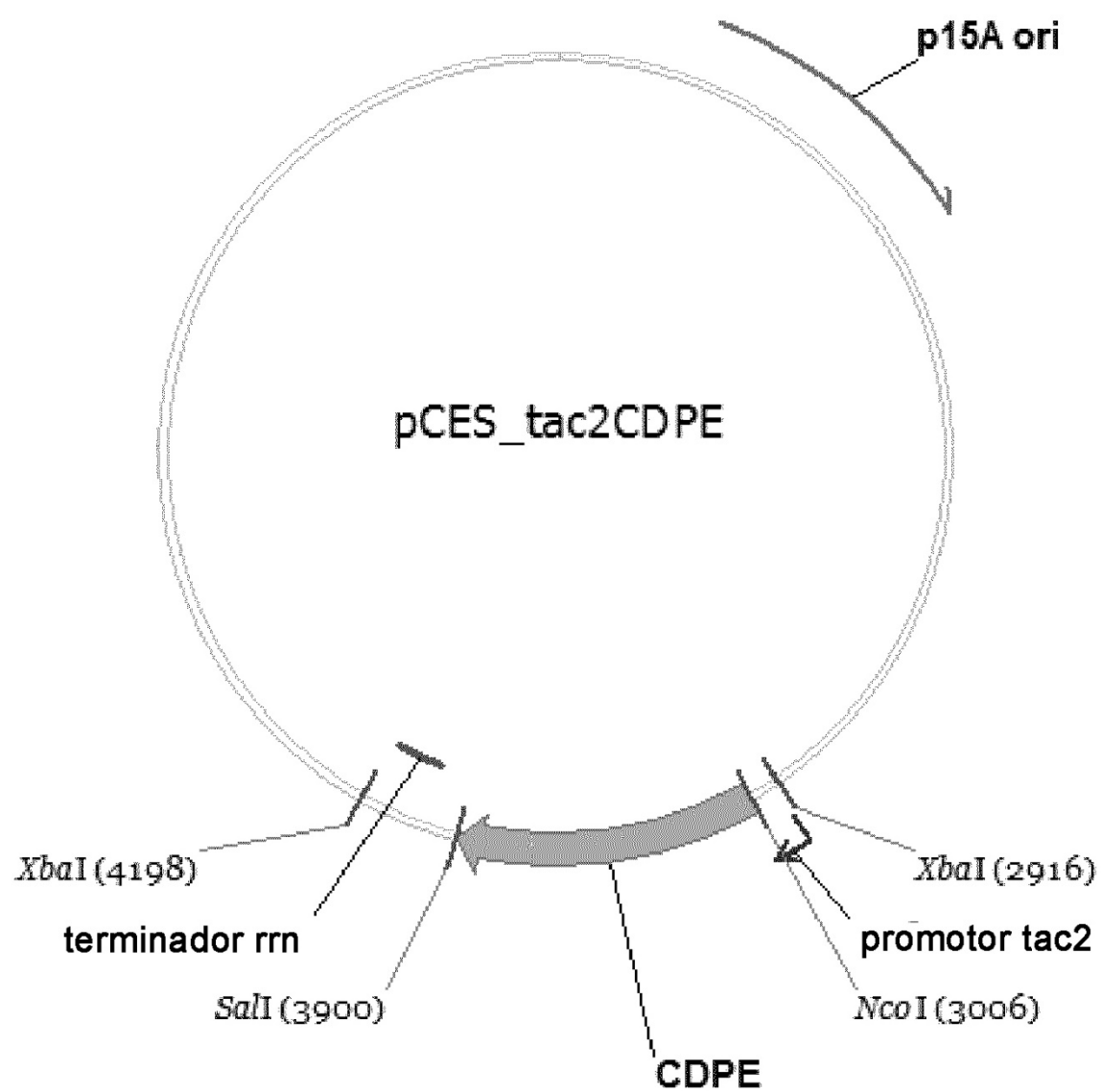
【FIG. 2】



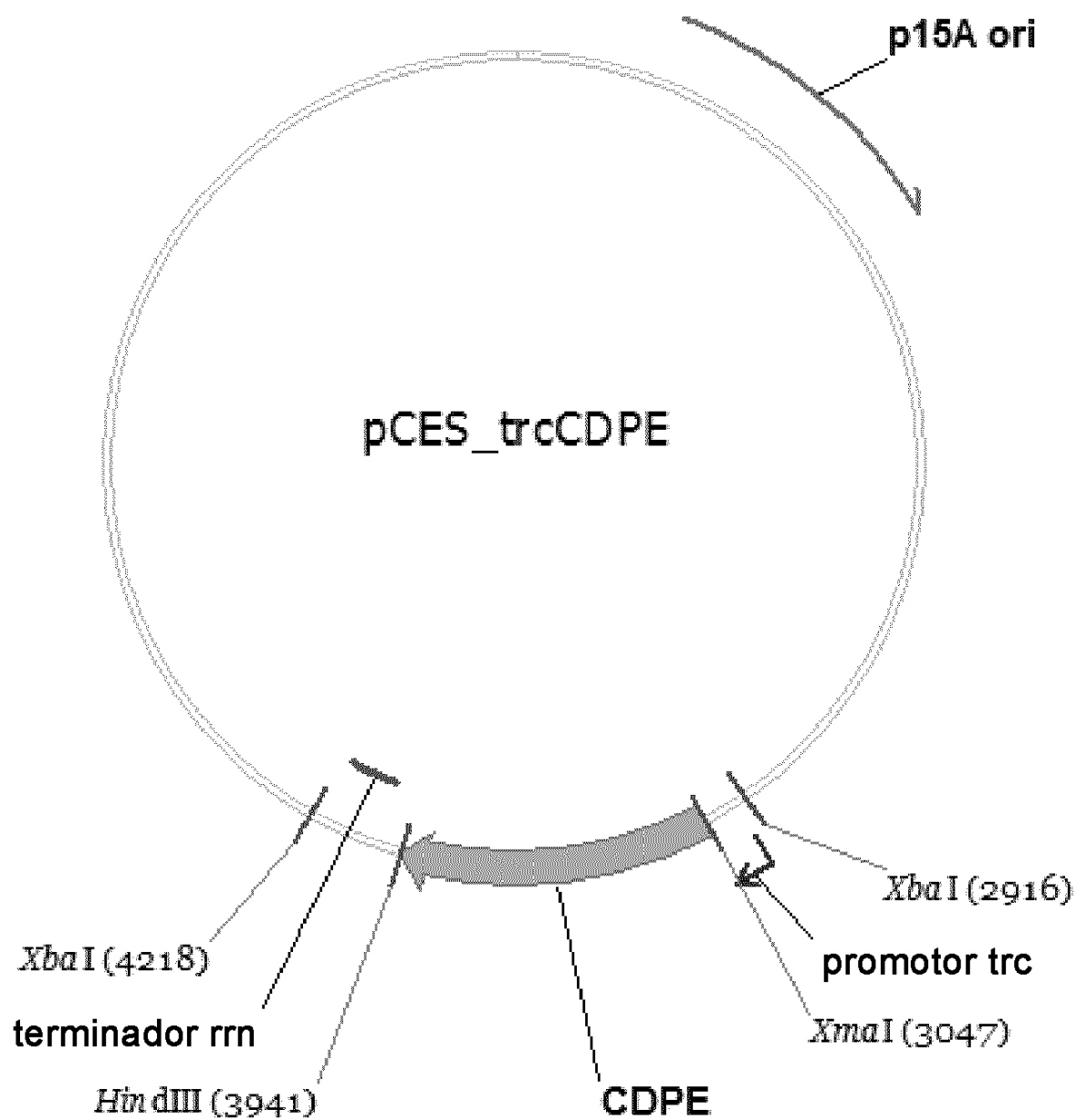
【FIG. 3】



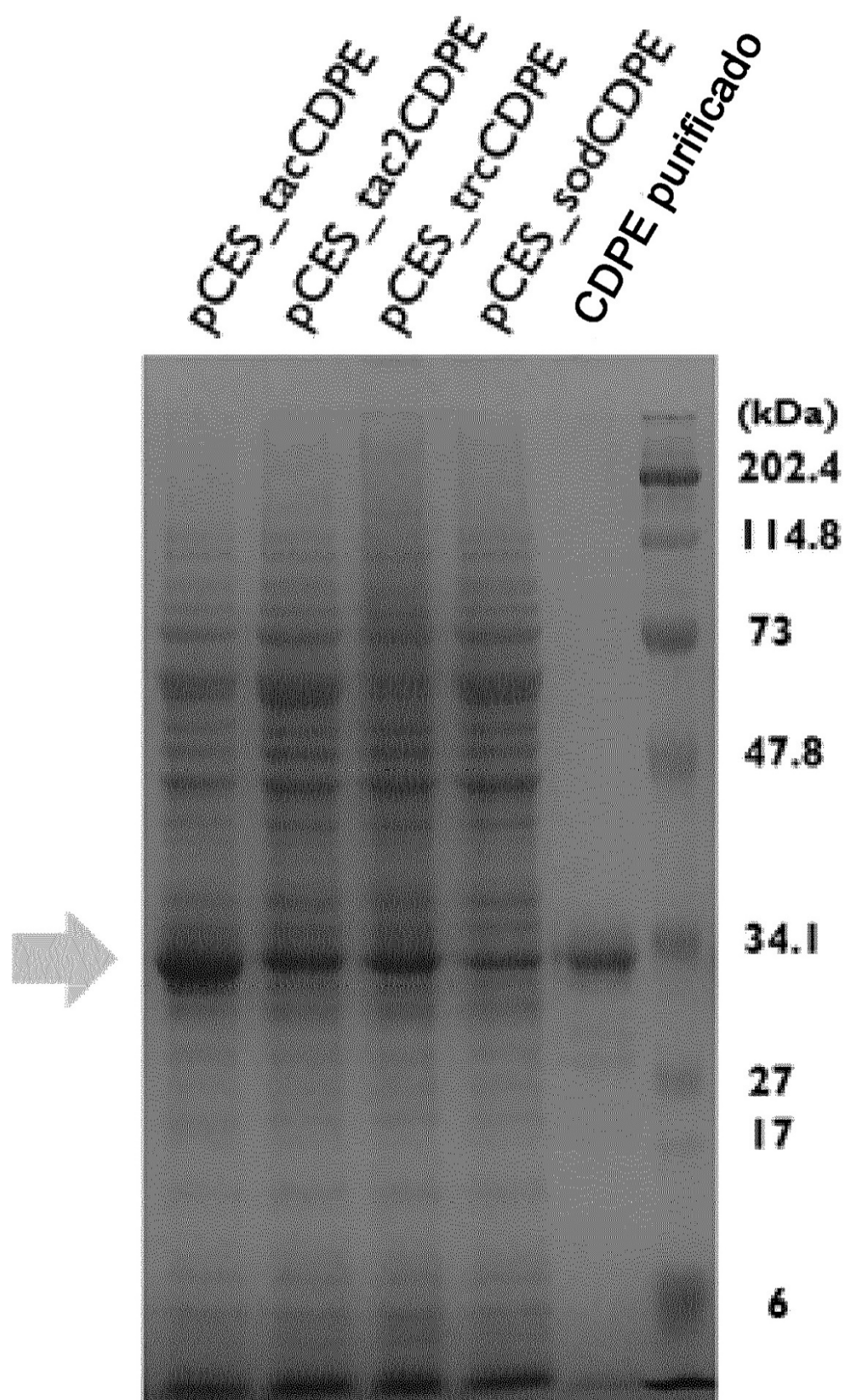
【FIG. 4】



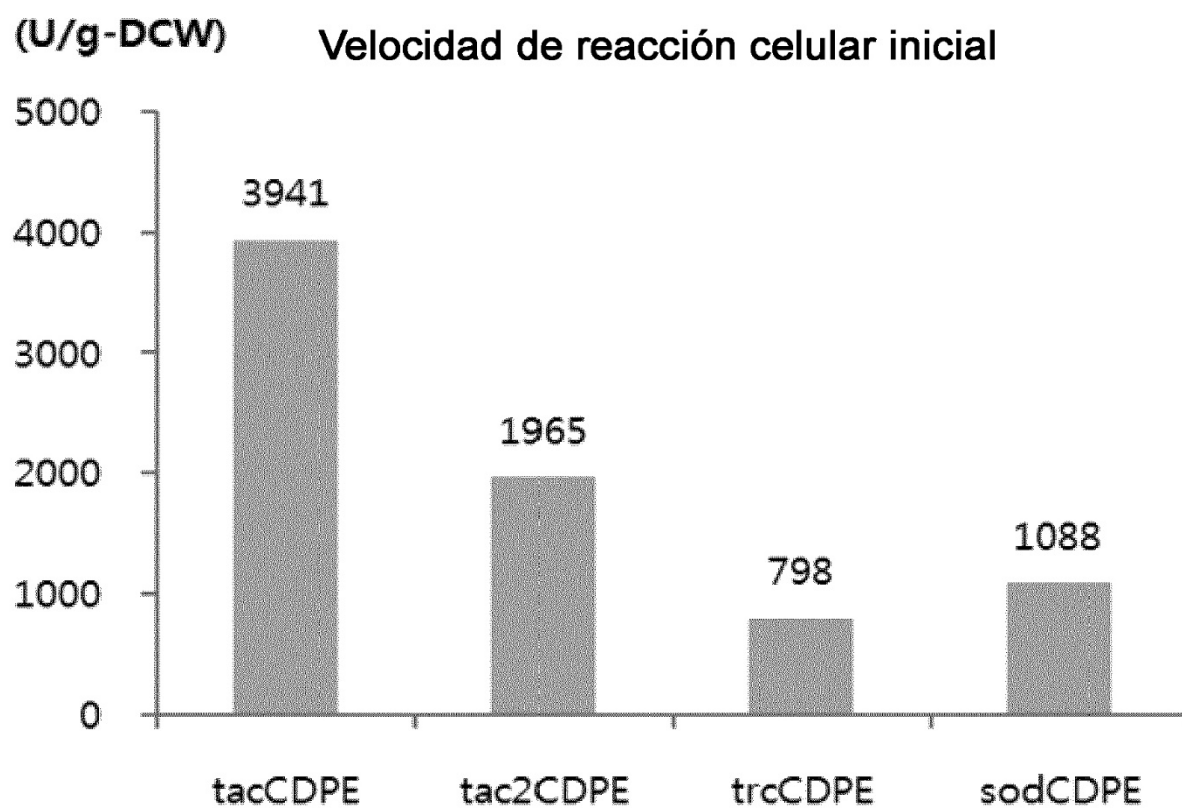
【FIG. 5】



【FIG. 6】



【FIG. 7】



【FIG. 8】

