(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 10 月 5 日 (05.10.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/167255 A1

(51) 国际专利分类号:
*C12N 9/90* (2006.01) *C12P 19/24* (2006.01)
*C12N 15/61* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/078923

(22) 国际申请日: 2017 年 3 月 31 日 (31.03.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610047300.4 2016 年 4 月 1 日 (01.04.2016) CN

(71) 申请人: **南京朗奈生物技术有限公司 (LANGNAI BIOTECH CO., LTD)** [CN/CN]; 中国江苏省南京市六合区科创大道 9 号, Jiangsu 211505 (CN)。 **翁源广业清怡食品科技有限公司 (L&P FOOD INGREDIENT CO., LTD)** [CN/CN]; 中国广东省韶关市翁源县翁城镇翁城工业园, Guangdong 512627 (CN)。

(72) 发明人: **王三永 (WANG, Sanyong)**; 中国广东省韶关市翁源县翁城镇翁城工业园, Guangdong 512627 (CN)。 **李春荣 (LI, Chunrong)**; 中国广东省韶关市翁源县翁城镇翁城工业园, Guangdong 512627 (CN)。 **韩诗蕾 (HAN, Shilei)**; 中国广东省韶关市翁源县翁城镇翁城工业园, Guangdong 512627 (CN)。 **严明 (YAN, Ming)**; 中国江苏省南京市六合区科创大道 9 号, Jiangsu 211505 (CN)。 **魏淼 (WEI, Miao)**; 中国江苏省南京市六合区科创大道 9 号, Jiangsu 211505 (CN)。 **陈圣 (CHEN, Sheng)**; 中国江苏省南京市六合区科创大道 9 号, Jiangsu 211505 (CN)。 **章志林 (ZHANG, Zhilin)**; 中国江苏省南京市六合区科创大道 9 号, Jiangsu 211505 (CN)。

(74) 代理人: **江苏圣典律师事务所 (JIANGSU SUNDY LAW FIRM)**; 中国江苏省南京市建邺区南湖路 58 号南苑大厦 10 楼杨文晰, Jiangsu 210017 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,

[见续页]

(54) Title: 3-EPIMERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING SAME

(54) 发明名称 : 一种 3-差向异构酶以及编码它的多核苷酸

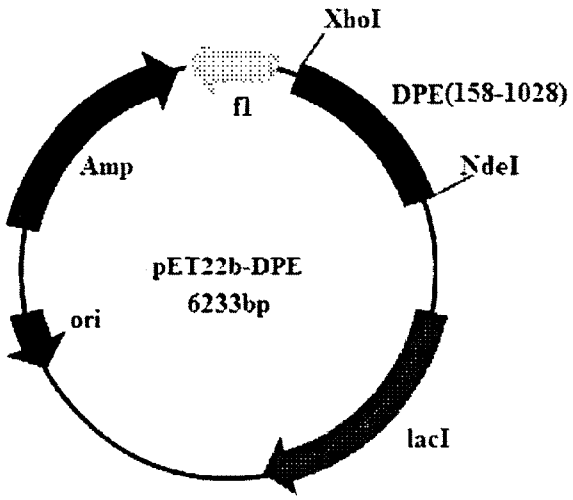



图 1

(57) Abstract: Provided are a 3-epimerase and a polynucleotide encoding the enzyme, a nucleic acid construct, vector and host cell comprising the polynucleotide, and the method for producing the 3-epimerase, and also provided is the use of the 3-epimerase.

(57) 摘要: 提供了一种 3-差向异构酶和编码该酶的多核苷酸，包含该多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞，以及生产该 3-差向异构酶的方法，还提供了该 3-差向异构酶的用途。

WO 2017/167255 A1

RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**根据细则 4.17 的声明**:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

**本国际公布**:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

# 一种3-差向异构酶以及编码它的多核苷酸

## 技术领域

**[0001]** 本发明涉及具有 3-差向异构酶活性的多肽或蛋白质，编码具有 3-差向异构酶活性的多肽或蛋白质的多核苷酸序列，包含所述多核苷酸序列的核酸构建体或表达载体，产生所述酶的方法，和所述酶在多种工业应用中的用途。

**[0002]** 此外，本发明涉及通过使用具有 3-差向异构酶活性的多肽或蛋白质催化果糖、葡萄糖、淀粉糖等单糖或混合糖生产 D-阿洛酮糖的方法，以及使用所述多肽或蛋白质催化山梨糖、淀粉糖等单糖或混合糖生产 D-塔格糖的方法。

## 背景技术

**[0003]** 随着人们对健康饮食的日益重视，研发健康安全的低热量功能性甜味剂成为食品行业研究的重点。D-阿洛酮糖和 D-塔格糖作为自然界中天然存在但含量极少的天然低热量功能性甜味剂，已经成为人们研究的热点。

**[0004]** D-阿洛酮糖（D-allulose）又名 D-核糖-2-己酮糖，是 D-果糖的 C-3 位的差向异构体。D-阿洛酮糖是一种天然存在但有含量极少的低热量功能性甜味剂，其甜度为蔗糖的 70%，但能量仅为蔗糖的 0.3%，可以用作低卡路里减肥食品的甜味剂，同时，D-阿洛酮糖还具有抑制肝中脂质合成有关酶活性的功能，有助于减少腹部脂肪堆积，并能一定程度上控制体重，可以用于健康食品等各种各样的功能性食品。此外， D-阿洛酮糖还能够改善食品风味、外观等，延长食品的保存期限。因此，D-阿洛酮糖这种健康安全的低热量功能性甜味剂已获得越来越多学者的关注，成为最具市场竞争力的新型甜味剂之一。

**[0005]** 由于 D-阿洛酮糖是一种较为稀有的天然单糖，从自然界中分离提取产量低，成本高，难以满足人们作为低热量健康甜味剂的需要，也不适宜工业化大生产的要求，因此为了应用于食品工业，需要有高效的 D-阿洛酮糖生产方法。传统的 D-阿洛酮糖生产方法主要为化学法，生产过程需要消耗大量费用、产生许多副产物和污染物。而生物法制备 D-阿洛酮糖具有反应专一性强，产物组分简单易纯化且属于天然产品等特点，已经成为研究的热点。

**[0006]** 生物法制备 D-阿洛酮糖最为有效的方法是寻找能使果糖转变为 D-阿洛酮糖的酶。然而，目前的阿洛酮糖-3-差相异构酶酶存在高温下稳定性降低或者活性低反应速度慢等问题，不利于工业化生产 D-阿洛酮糖的成本控制。因此，需要开发高温稳定性优良、活性高的阿洛酮糖-3-差向异构酶以适应工业化生产的需求。

**[0007]** D-塔格糖（D-Tagatose），是 D-山梨糖的 C-3 位的差向异构体。D-塔格糖是一种天然存

在但有含量极少的低热量功能性甜味剂，其甜度为蔗糖的92%，在人体内吸收率较低，仅为20%~25%，不会引起机体血糖水平的明显变化,很适合糖尿病人食用，而且绝大部分塔格糖直接进入结肠,被其中微生物菌群所选择性发酵,促进有益菌增殖,抑制有害菌的生长,起到明显的改善肠道菌群的作用,是一种很好的益生素，可以用于健康食品等各种各样的功能性食品。此外， D-塔格糖还能够改善食品风味、外观等。因此，D-塔格糖这种健康安全的低热量功能性甜味剂已获得越来越多学者的关注，成为极具市场前景的新型甜味剂之一。

**[0008]** 使山梨糖异构为D-塔格糖是生物法制备D-塔格糖最为有效的方法之一，这种方法的关键是寻找能使山梨糖转变为D-塔格糖的酶。目前的塔格糖-3-差相异构酶存在高温下稳定性降低或者活性低反应速度慢等问题，不利于工业化生产D-塔格糖的成本控制和规模放大。因此，需要开发高温稳定性优良、活性高的塔格糖-3-差相异构酶以适应工业化生产的需求。

## 发明内容

**[0009]** 本发明人从Thermogemmatispora carboxidivorans菌种发现了一种新型具有3-差向异构酶活性的蛋白质。相应地，本发明提供了具有3-差向异构酶活性的新型蛋白质，和编码所述蛋白质或多肽的多核苷酸。所述蛋白质或多肽具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性。本发明的蛋白质或多肽具有良好的活性和优秀的热稳定性，这两点对较高温度条件下生产D-阿洛酮糖和D-塔格糖而言是优良的性能。

**[0010]** 本发明涉及具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性的分离的蛋白质或多肽，其选自下组：

(a)蛋白质或多肽，其与SEQ ID No：2的氨基酸序列具有至少70%序列同一性；

(b)蛋白质或多肽，其由多核苷酸编码，所述多核苷酸在中等-高严格条件下与以下杂交：(i)SEQ ID No：1的多肽编码序列，(ii)包含SEQ ID No：1的多肽编码序列的基因组 DNA序列，或(iii)(i)或(ii)的全长互补链；

(c) 蛋白质或多肽，其由多核苷酸编码，所述多核苷酸与SEQ ID NO：1的蛋白质或多肽编码序列具有至少70%序列同一性；

(d)SEQ ID NO：2的蛋白质或多肽包含一个或多个（几个）氨基酸的取代、缺失和/或插入的变体；和

(e) 任何(a)、(b)或(c)的蛋白质或多肽，其包含SEQ ID No：2或由SEQ ID No：2组成，和

(f) (a)，(b)，(c)，(d)，或(e)的蛋白质或多肽的片段，其具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性。

**[0011]** 本发明亦涉及包含所述多核苷酸的核酸构建体、表达载体和重组宿主细胞：并涉及产

生多核苷酸的方法。

**[0012]** 本发明亦涉及酶法生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖的方法。

**[0013]** 定义

阿洛酮糖-3-差向异构酶活性：术语“阿洛酮糖-3-差向异构酶活性”意指催化果糖的 C-3 位异构转化为 D-阿洛酮糖的活性。

**[0014]** 塔格糖-3-差向异构酶活性：术语“塔格糖-3-差向异构酶活性”意指催化山梨糖的 C-3 位异构转化为 D-塔格糖的活性。

**[0015]** 分离的蛋白质或多肽：术语“分离的蛋白质或多肽”意指相对于如见于自然界的蛋白质或多肽经人力修饰的多肽。在一个方面，多肽如通过 SDS-PAGE 测定的，为至少 1%纯，例如至少 5%纯，至少 10%纯，至少 20%纯，至少 40%纯，至少 60%纯，至少 80%纯，并且最优选至少 90%纯。

**[0016]** 分离的蛋白质或多肽的非限定性实例包括：（1）任何非天然存在的蛋白质或多肽，（2）任何蛋白质或多肽，其包括但不限于任何酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子，它们至少部分地从与其在自然界结合的一种或多种或所有天然存在的组分移出；（3）任何蛋白质或多肽，其相对于见于自然界的蛋白质或多肽经人工修饰：或（4）任何蛋白质或多肽，其通过相对于与其天然结合的其它组分增加所述蛋白质或多肽的量而受修饰。分离的蛋白质或多肽可存在于发酵液样品。

**[0017]** 基本上纯的蛋白质或多肽：术语“基本上纯的蛋白质或多肽”意指蛋白质或多肽制备物，所述蛋白质或多肽制备物含有按重量计至多 10%的与其天然或重组结合的(associated)的其它蛋白质或多肽材料。优选地，所述蛋白质或多肽是按存在于制备物中的全部蛋白质或多肽材料的重量计至少 90%纯。本发明的蛋白质或多肽优选是基本上纯的形式，例如，这能够通过以下实现：通过公知的重组方法或由经典纯化方法制备多肽。

**[0018]** 序列同一性：参数“序列同一性"描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

**[0019]** 就本发明而言，两个氨基酸序列之间的序列同一性程度通过使用如 EMBOSS 软件包(EMBOSS：The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice 等，2000，Trends in Genetics 16：276-277）（优选 3.0.0 版或更高版木）的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman 和 Wunsch, 1970，J. Mol. Biol. 48：443-453）来测定。使用的可选参数为缺口开放罚分(gap open penalty)为 10，缺口延伸罚分(gap extension penalty)为 0.5 和 EBLOSUM62（BLOSUM62 的 EMBOSS 版）取代矩阵。使用 Needle 标记为“最高同一性(longest identity)

"的输出结果（使用-nobrief 选项获得）作为同一性百分比，并计算如下：

（同样的残基× 100）/（比对长度一比对中缺口的总数）

就本发明而言，两个核苷酸序列之间的序列同一性程度通过使用如 EMBOSS 软件包(EMBOSS：The European Molecular Bi010 Open Software Suite, Rice 等，见上文）（优选 3.0. 0 版或更高版本)的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman 和 Wunsch, 1970，见上文）来测定。使用的可选参数为缺口开放罚分为 10，缺口延伸罚分为 0.5 和 EDNAFULL(NCBI NUC4. 4 的 EMBOSS 版）取代矩阵。使用 Needle 标记为“最高同一性”的输出结果（使用-nobrief 选项获得）作为同一性百分比，并计算如下：

（同样的脱氧核糖核苷酸× 100）/（比对长度一比对中缺口的总数）

片段：术语“片段”意指从成熟多肽的氨基和（或）羧基末端缺失一个或多个（几个）氨基酸的多肽；其中所述片段具有 3-差向异构酶活性。

**[0020]** 等位变体(allelic variant)：术语“等位变体”意指占据相同染色体基因座的基因的任何两种或两种以上可选形式。等位变异通过突变天然地发生，并且可导致种群内的多态性。基因突变可以是沉默的（在编码的多肽中无变化）或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体是由基因的等位变体编码的多肽。

**[0021]** 分离的多核苷酸：术语“分离的多核苷酸”意指相对于见于自然界的多核苷酸经人力修饰的多核苷酸。在一个方面，分离的多核苷酸如通过琼脂糖电泳测定的，为 1%至 95%纯。所述多核苷酸可为基因组、cDNA、RNA、半合成、合成来源，或其任意组合。

**[0022]** 本上纯的多核苷酸：术语“基本上纯的多核苷酸"意指不含其它外来的或不期望的核苷酸的多核苷酸制备物，并且所述多核苷酸制备物处于适合于在遗传工程的蛋白质生产体系中使用的形式。因此，基本上纯的多核苷酸含有按重量计 0.5%至 10%的与其天然或重组结合的其它多核苷酸材料。然而，基本上纯的多核苷酸可以包括天然存在的 5’和 3’非译区，如启动子和终止子。优选地，基本上纯的多核苷酸是按重量计 90%至 99.5%纯的。本发明所述多核苷酸优选为基木上纯的形式。

**[0023]** 编码序列：术语“编码序列”意指直接指定多肽氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界通常由开放阅读框决定，所述开放阅读框通常以 ATG 起始密码子或可供选择的起始密码子例如 GTG 和 TTG 开始，并且以终止密码子如 TAA、TAG 和 TGA 结束。编码序列可以是 DNA、cDNA、合成的或重组的多核苷酸。

**[0024]** cDNA：术语“ cDNA ”意指能够通过反转录从得自真核细胞的成熟的、已剪接的 mRNA 分子制备的 DNA 分子。cDNA 缺少通常存在于相应基因组 DNA 中的内含子序列。起始的

(initial)、初级的 RNA 转录物是 mRNA 的前体，其通过一系列的步骤（包括剪接）加工然后作为成熟的已剪接的 mRNA 出现。

**[0025]** 核酸构建体：术语“核酸构建体”意指单链或双链的核酸分子，其分离自天然存在的基因，或将其以本来不存在于(not otherwise exist)自然界中的方式修饰以含有核酸的区段，或其为合成的。当所述核酸构建体含有表达本发明的编码序列所需的调控序列时，术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。

**[0026]** 调控序列(control sequence)：术语“调控序列”意指对编码本发明多肽的多核苷酸表达是必需的所有成分。各个调控序列对于编码所述多肽的核苷酸序列可以是天然的或外源的，或各个调控序列对于彼此可以是天然的或外源的。这些调控序列包括但不限于前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列和转录终止子。最低限度，调控序列包括启动子以及转录和翻译的终止信号。调控序列可以和用于引入特异性限制位点目的的接头一起提供，所述特异性限制位点促进调控序列与编码多肽的多核苷酸的编码区的连接。

**[0027]** 可操作地连接：术语“可操作地连接”意指这样的构型，其中将调控序列置于相对于多核苷酸的编码序列的适当位置，使得调控序列指导编码序列的表达。

**[0028]** 表达：术语“表达"包括涉及多肽产生的任何步骤，其包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

**[0029]** 表达载体：术语“表达载体"意指线性的或环状的 DNA 分子，其包含编码多肽的多核苷酸，并且所述多核苷酸与提供用于其表达的额外核苷酸可操作地连接。

**[0030]** 宿主细胞：术语“宿主细胞"意指任何细胞类型，所述细胞类型对于使用包含本发明多核苷酸的核酸构建体或表达载体的转化、转染、转导等是易感的(susceptible) '术语“宿主细胞"涵盖任何亲本细胞的后代，其由于在复制过程中发生的突变而不同于亲本细胞。

**[0031]** 变体：术语“变体"意指具有 3-差向异构酶活性的蛋白质或多肽，其在一个或多个（几个）位置包含改变，即一个或多个（几个）氨基酸残基的取代、插入和（或）缺失。取代意指用不同的氨基酸替代占据某位置的氨基酸：缺失意指移出占据某位置的氨基酸；和插入意指紧邻占据某位置的氨基酸添加 1-3 个氨基酸。

**[0032]** 发明详述

本发明人研究了源自 Thermogemmatispora carboxidivorans 菌的差向异构酶多肽的特性，在对其进行将果糖转化为 D-阿洛酮糖及将山梨糖转化为 D-塔格糖的实验时发现，上述多肽具有使果糖及山梨糖第 3 个碳位发生差向异构化反应、使其转化为 D-阿洛酮糖或 D-塔格糖的功能，这是通过以下步骤进行的：合成源自 Thermogemmatispora carboxidivorans 菌的差向异构酶基

因，培养包含所述基因表达载体的微生物，并过表达该多肽。经过实验，发现该多肽具有良好的阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性和优秀的热稳定性。因此，本发明提供了一种具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性的多肽，并利用所述具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性的多肽生产 D-阿洛酮糖或 D-塔格糖的方法。

**[0033]** 为了确定该差向异构酶的多肽的特性，在本发明中，通过基因合成从 Thermogemmatispora carboxidivorans 菌株中获得该标注为差向异构酶的多肽的基因，所标注的差向异构酶基因是仅根据 DNA 碱基序列，而不是根据其功能方面的表征结果所定义的。然后，将所获得的差向异构酶基因插入到适合的表达载体中，从而产生含有差向异构酶基因的重组载体，并且将所述重组载体转化到适合的微生物中。将该转化的微生物培养在发酵培养基中，并在该微生物中过表达所述差向异构酶基因的多肽产物，然后分离和纯化所述差向异构酶基因的多肽产物，以备用。经过实验，发现该多肽具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性，能够转化果糖生成 D-阿洛酮糖，也能转化山梨糖生成 D-塔格糖。

**[0034]** 由本发明的方法所产生的新型 3-差向异构酶活性的多肽可具有这样的氨基酸序列，该序列不仅限于 SEQ ID No：2 的氨基酸序列，而且包括由 SEQ ID No：2 的氨基酸序列中一些氨基酸残基的替换、插入或缺失所形成的氨基酸序列，只要这些氨基酸修饰过的蛋白质或多肽具有阿洛酮糖-3-差向异构酶及塔格糖-3-差向异构酶活性，能够转化果糖或山梨糖生成 D-阿洛酮糖或 D-塔格糖。

**[0035]** 在本发明的方法中，能用于产生重组表达载体的表达载体可以是任何常规用于遗传重组技术的表达载体，并且可以是，例如，pET-22b(+)。能够通过重组表达载体转化的微生物可以是大肠杆菌(E. coli)BL21(DE3)。然而，所述微生物是不受限制的，只要它是任何这样的微生物，即该微生物能够在经过包含所需要基因的重组表达载体转化后过表达该基因，并且作为过表达的结果能够产生活性蛋白质或多肽。

**[0036]** 更详细地，以下培养转化的微生物和诱导本发明的蛋白质或多肽过表达的过程可以根据本发明的示范的实验方案如以下描述进行。将低温保存的重组大肠杆菌接种到装有 50mL LB 培养基的 250mL 的烧瓶中，并将该菌株在维持在 37 ℃的摇床中培养，直到 600nm 处的吸光度达到 2.0。将该培养溶液加入到装有 5L 发酵培养基的 7L 的发酵罐中，所述发酵培养基由 15g/L 蛋白胨，25g/L 酵母提取物，10g/L 氯化钠，2 g/L 葡萄糖，3 g/L 乳糖组成，并将该混合物在所述发酵罐中培养，以诱导本发明的蛋白质的过表达。在发酵过程中，搅拌速率为 500rpm，通气量为 1.0 vvm，及培养温度为 37 ℃，而且上述培养条件有利于大规模生产

3-差向异构酶。

**[0037]** 为了纯化由过表达所产生的蛋白质，将所述重组大肠杆菌培养溶液在 6,000 × g，4℃离心 30 分钟，然后用 0.85%的 NaCl 洗涤两次。随后，将该细胞重新悬浮于 50 mM pH8.0 的磷酸钠缓冲溶液（含有 300mM NaCl）中，并将含有所述细胞的缓冲溶液置于冰浴中 30 分钟。利用高压均质机破碎该缓冲溶液中的细胞，将破碎的细胞在 13,000 × g，4℃离心 20 分钟，并将其除去，而使上清液通过孔径 0.45um 的滤膜进行过滤，并通过低温条件下的快速蛋白质色谱法对其进行纯化。将含有本发明的蛋白质的滤出液加入 HisTrap HP 柱，所述 HisTrap HP 柱是经过 50 mM pH8.0 的磷酸钠缓冲溶液平衡的，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 300mM NaCl 和 10 mM 咪唑。随后，用相同的磷酸钠缓冲溶液洗涤该 HisTrap HP 柱，并且再用含有浓度梯度为从 10 mM 到 200mM 的咪唑的相同磷酸钠缓冲溶液洗脱附着于该柱的蛋白质，其流速为 1mL /min。将含有本发明蛋白质的洗脱液加入到 HiPrep 16/60 树脂柱中去除咪唑，所述 HiPrep 16/60 树脂柱是经过 pH7. 5 的 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液平衡的，并且再以 6mL/min 的速率洗脱该蛋白质。将由此所收集的蛋白质溶液加入到 Sephacryl S-100 HR 柱中以洗脱该蛋白质，所述 Sephacryl S-100HR 柱是经过 pH7.5 的含有 0.15M NaCl 的 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液平衡的，其流速为 6mL/min，最后将洗脱的白质在 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中进行透析。

**[0038]** 如上述所获得的本发明的蛋白质是 3-差向异构酶，所述 3-差向异构酶的单体分子量为 31770 Da。该 3-差向异构酶是金属酶，金属离子对其活性有明显促进。

**[0039]** 根据本发明的另一个实施方案，3-差向异构酶在金属离子的存在下反应，可实现提高由果糖生产 D-阿洛酮糖产量的目的，也可实现提高由山梨糖生产 D-塔格糖产量的目的。所述金属离子选自下列各项组成的组：锰、镁和钴，其浓度范围为 0.5 – 5mM，例如，1 mM。当所述金属离子的浓度低于 0.5 mM 时．提高转化率的作用并不明显，而当所述金属离子的浓度高于 5 mM 时，转化率并没有显著的差异。

**[0040]** 该 3-差向异构酶和果糖或山梨糖间的反应可利用浓度为 10-75%(w/w)，pH6-8 和温度为 50-90℃的底物（即果糖或山梨糖溶液）进行。当该底物，即果糖或山梨糖的浓度在 10-75%(w/w)的范围内时，D-阿洛酮糖或 D-塔格糖的产量好，转化率高，且上述范围的 pH 和温度条件是对 3-差向异构酶活性最佳的 pH 和温度范围。

**[0041]** 该 3-差向异构酶具有优良的热稳定性，在 60℃保温 12 小时后活性仍没有检测到活性下降，在 80℃保温 12 小时后，活性仍然保持在 80%以上，在 90℃保温 8 小时后仍然有 50%的残余活性。该 3-差相异构酶优良的热稳定性对较高温度条件下生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖而言是优良的性能。

**[0042]** 根据本发明另一个实施方案，该 3-差向异构酶转化果糖生产 D-阿洛酮糖和转化山梨糖生产 D-塔格糖的反应可通过在反应过程中将 3-差向异构酶固定在载体上进行，这是因为固定在载体上的 3-差向异构酶能够长期地保持酶活性且便于重复使用。用于本发明目前的实施方案中的载体可以是任意已知其在酶固定化中用途的载体，并且可以是例如，海藻酸钠。海藻酸钠是天然胶体多糖，它在藻类细胞壁中很丰富，且含了β-D-甘露糖醛酸和α-L-古洛糖醛酸残基，所述β-D-甘露糖醛酸和α-L-古洛糖醛酸残基通过β-1,4 键随机连接。因此，海藻酸钠容许 3-差向异构酶稳定的固定，且有利于获得较高的 D-阿洛酮糖或 D-塔格糖产量。为了获得 D-阿洛酮糖或 D-塔格糖的最大产量，海藻酸钠可用于进行 3-差向异构酶的固定，其浓度为 1.5-4%(w/v)，例如浓度为 2.5%(w/v)。当海藻酸钠用作固定 3-差向异构酶的载体时，将所述 3-差向异构酶的溶液加入到海藻酸钠水性溶液中，所述海藻酸钠水性溶液的体积是 3-差向异构酶溶液体积的一倍或两倍，然后利用注射器泵和真空泵将该混合物逐滴地加入到 0.2M 钙离子溶液中，从而形成 3-差向异构酶-海藻酸钠复合体球。这些 3-差向异构酶-海藻酸复合体球可接用于转化果糖生产 D-阿洛酮糖以及转化山梨糖生产 D-塔格糖的反应中。

**[0043]** 本发明的 3-差向异构酶对果糖和山梨糖均具有良好的活性和优良的热稳定性，这两点对较高温度条件下生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖而言是优良的性能。根据本发明实施方案的生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖的方法是对环境友好的，这是因为使用了源自微生物的酶，并且该方法要求简单的酶固定化过程，以及显著地增加了 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖的生产产量和生产效率，因此降低了生产成本，而最大化了生产的效果。

**[0044]** 由此生产的 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖能够有效地用作食品或药物的添加剂。

**[0045]** 有利作用

本发明的 3-差向异构酶对果糖和山梨糖均具有良好的活性和优良的热稳定性，这两点对高温度条件下生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖而言是优良的性能。根据本发明实施方案的生产 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖的方法是对环境友好的，这是因为使用了源自微生物的酶，并且该方法要求简单的酶固定化过程，以及显著地增加了 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖的生产产量和生产效率，因此降低了生产成本，而最大化了生产的效果。

**[0046]** 由此生产的 D-阿洛酮糖和 D-塔格糖能够有效地用作食品或药物的添加剂。

**附图说明**

**[0047]** 图 1 是本发明实施例 1 中 3-差向异构酶的生产流程图；

图 2-1 是本发明实施例 5 中 pH 对于 3-差向异构酶活性影响的曲线图；

图 2-2 是本发明实施例 5 中温度对于 3-差向异构酶活性影响的曲线图；

图 3 是本发明实施例 6 中温度活性关系图；

图 4 是本发明实施例 7 中利用 3-差向异构酶所转化果糖生产 D-阿洛酮糖的转化率示意图；

图 5 是本发明实施例 11 中利用 3-差向异构酶所转化山梨糖生产 D-塔格糖的转化率示意图。

**具体实施方式**

**[0048]** 下文中，将参考具体实施例对本发明进行更详细地描述。这些实施例仅仅是为了例证的目的，而非意欲限制本发明的范围。

**[0049]** 在目前的试验实施例中，利用果糖和山梨糖作为底物测量了其酶活性。为了测量其酶活性，将 3-差向异构酶与含有 10%果糖或山梨糖的 50mM pH7.5 磷酸钠缓冲溶液混合，在 60 ℃条件下反应 20 分钟，再在 100℃加热该反应溶液 15 分钟，以终止该反应。所述含有果糖或山梨糖的磷酸钠缓冲溶液是通过将果糖或山梨糖溶解于 pH7-8 的磷酸钠缓冲溶液中，以达到浓度 60-70%(w/v)配制而成的，并且将该含有果糖或山梨糖的磷酸钠缓冲溶液持续地加入到维持在 60℃的生物反应器中。为了实现方便比较其酶活性的目的，将一单位的阿洛酮糖-3-差向异构酶定义为在 pH7.5 和 60 ℃条件下每分钟生产 1 摩尔 D-阿洛酮糖所需要的阿洛酮糖-3-差向异构酶的量；将一单位的塔格糖-3-差向异构酶定义为在 pH7.5 和 60 ℃条件下每分钟生产 1 摩尔 D-塔格糖所需要的塔格糖-3-差向异构酶的量。果糖、D-阿洛酮糖、山梨糖、D-塔格糖的浓度是利用高效液相色谱法测量的，该高效液相色谱法使用 BP-100 钙离子碳氢化合物柱和 RI 检测器，柱温 80℃，流动相为超纯水，流速 0.5 mL/min。

**[0050]** 实施例 1：3-差向异构酶的生产

3-差向异构酶基因是通过合成 Thermogemmatispora carboxidivorans 中标注为差向异构酶的多肽的基因获得的，所述差向异构酶基因是仅根据序列，而不是根据其功能方面的表征结果所定义的。通过利用限制性内切酶 NdeI 和 XhoI，将获得的差向异构酶基因插入到表达载体 pET-22b(+)中，从而产生重组表达载体 pET-22b(+)/差向异构酶（见图 1）。通过常规转化方法，将该重组达载体转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中。将转化得到的重组大肠杆菌 BL21(DE3)保藏在-80℃的超低温冰箱中。

**[0051]** 此后，将该重组大肠杆菌接种在装有 50mL 液体 LB 培养基的 250mL 三角烧瓶中，并在 37 ℃的摇床中培养活化，直到培养液在波长 600nm 处的吸光度达到 2.0。将该培养液加入到装有 5L 发酵培养基的 7L 的发酵罐中，进行发酵培养以大规模生产 3-差向异构酶。在发酵过程中，维持搅拌速率为 500rpm，通风率为 1.0 vvm，培养温度为 37℃。

**[0052]** 实施例 2：3-差向异构酶的纯化

为了对 3-差向异构酶的性质进行表征，利用亲合色谱法（HisTrap HP 柱），HiPrep 16/60 柱和

Sephacryl S-100 HR 柱纯化 3-差向异构酶。

**[0053]** 测量了该纯化的 3-差向异构酶的分子量，发现该 3-差向异构酶单体分子量为 31770Da 的。证实了该 3-差向异构酶的氨基酸序列与 NCBI 登记号 WP_052889376 的氨基酸序列相同。

**[0054]** 实施例 3：3-差向异构酶的金属依赖性

在实施例 3 中，为了研究金属离子的对该 3-差向异构酶的影响，在不同金属离子存在条件下将果糖作为底物测定对其活性的影响，测量是在用 EDTA 处理该 3-差向异构酶后，向 3-差向异构酶溶液中加入 1 mM 下表 1 中所示的各种金属离子后进行的。该 3-差向异构酶反应在 50 mMpH7.5 的 Tris 缓冲溶液中，60℃条件下进行 20 分钟，其中所述 Tris 缓冲溶液含有 0.04 U/mL 的 3-差向异构酶和 10%(w/v)的果糖，再将该反应溶液在 100℃加热 15 分钟，以终止该反应，然后测量该 3-差向异构酶的活性。

**[0055]** 结果显示该 3-差向异构酶具有金属依赖性，如下表 1 所示，镁、锰和钴离子增强其酶活性，而铜和锌离子抑制其酶活性。

**[0056]** 表 1

| 金属离子 | 相对活性（%） |
|---|---|
| 无 | 100 |
| $Co^{2+}$ | 170 |
| $Ca^{2+}$ | 65 |
| $Mn^{2+}$ | 168 |
| $Mg^{2+}$ | 130 |
| $Zn^{2+}$ | 0 |
| $Cu^{2+}$ | 0 |
| $Na^{+}$ | 120 |
| $K^{+}$ | 113 |

实施例 4：3-差向异构酶的底物特异性

该 3-差向异构酶反应在 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，pH7.5 和 60 ℃条件下进行 20 分钟，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 0.04U/ml 的该 3-差向异构酶和 10 mM 下表 2 中所示的各种单独的单糖，再将每个反应溶液在 100 ℃加热 15 分钟，以终止该反应，然后，测量了每种反应溶液中该 3-差向异构酶的酶活性。

**[0057]** 结果显示该 3-差向异构酶对 D-果糖、D-阿洛酮糖、D-山梨糖、D-塔格糖均具有活性，该 3-差向异构酶除可用于生产 D-阿洛酮糖，也可用于生产 D-塔格糖。

**[0058]** 表 2

| | 相对活性（%） |
|---|---|
| 果糖 | 63.9 |
| D-阿洛酮糖 | 100 |
| 山梨糖 | 21 |
| D-塔格糖 | 40.7 |

实施例 5：pH 和温度和对 3-差向异构酶活性的影响

在实施例 5 中，为了研究不同 pH 和温度对该 3-差向异构酶活性的影响，在不同的温度和 pH 条件下将果糖作为底物测定对其活性的影响，且比较了在不同温度和 pH 下的酶活性。为了研究 pH 的作用，该 3-差向异构酶的反应在 pH 范围 6.0-8.5 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中进行，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 0.04U/mL 的该 3-差向异构酶和 10%(w/v)的果糖。在此，各自的反应在 60℃、无金属离子加入的条件下进行 20 分钟，然后在 100 ℃加热 15 分钟来终止该反应，并测量了其酶活性。其结果在图 2-1 中所说明。

**[0059]** 为了研究温度的作用，该反应在 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，温度范围 40-90℃中进行了 20 分钟，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 0.04 U/mL 的该 3-差向异构酶和 10%(w/v)的果糖，在 pH7.5 条件下进行反应。通过在 100 ℃加热 15 分钟来终止该反应，并测量了其酶活性。其结果在图 2-2 中所说明。

**[0060]** 结果显示该 3-差向异构酶的最佳 pH 和温度分别为 7.5 和 90℃。

**[0061]** 图 2-1 是显示在本发明实施方案条件下 pH 对于 3-差向异构酶活性影响的曲线图。

**[0062]** 图 2-2 是显示在本发明实施方案条件下温度对于 3-差向异构酶活性影响的曲线图。

**[0063]** 实施例 6:3-差向异构酶的热稳定性

在实施例 6 中，为了研究该 3-差向异构酶的热稳定性，将该 3-差向异构酶分别置于不同温度条件下保温，在不同时间取样将果糖作为底物测定其残余活性。测量是在将该 3-差向异构酶分别置于 50℃、60℃、70℃、80℃和 90℃水浴条件下保温后，每隔 1 小时取样进行的。该 3-差向异构酶反应在 50 mMpH7.5 的磷酸钠缓冲溶液中，60℃条件下进行 20 分钟，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 0.04 U/mL 的 3-差向异构酶和 10%(w/v)的果糖，再将该反应溶液在 100℃加热 15 分钟，以终止该反应，然后测量该 3-差向异构酶的活性。其结果在图 3 中所说明。

**[0064]** 结果显示该 3-差向异构酶具有优良的热稳定性，在 60℃保温 12 小时后活性仍没有检测到活性下降，在 80℃保温 12 小时后，活性仍然保持在 80%以上，在 90℃保温 8 小时后仍然有 50%的残余活性。

**[0065]** 实施例 7：利用 3-差向异构酶所转化果糖生产 D-阿洛酮糖的转化率

在实施例 7 中，该 3-差向异构酶的反应在 pH7.5 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，温度范围 40-90℃

条件下进行 12 小时，从而容许该反应充分地进行，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有该 3-差向异构酶 0.04 U/mL，1 mM 的钴离子，和 10%(w/v)的果糖。然后，通过在 100℃加热 15 分钟来终止该反应，并测量样品中果糖和 D-阿洛酮糖的含量。其结果在图 4 中所说明。

**[0066]** 结果显示在 12 小时后该 3-差向异构酶转化果糖生产 D-阿洛酮糖的转化率在 90℃时转化率最高，为 39%，50℃时转化率最低，为 22%，而在 60 ℃时转化率为 37%。

**[0067]** 实施例 8：利用 3-差向异构酶生产 D-阿洛酮糖

为了生产高浓度的 D-阿洛酮糖，该反应在 pH7.5 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，60 ℃条件下进行反应，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 10 U/mL 的该 3-差向异构酶，1 mM 的钴离子和 700g/L 的果糖。然后在不同反应时间点取样，通过在 100 ℃加热 15 分钟终止该反应，并测量样品中 D-阿洛酮糖的浓度。不同反应时间的 D-阿洛酮糖产量显示在下表 3 中。

**[0068]** 表 3

| | D-阿洛酮糖(g/L) |
|---|---|
| 1 | 98 |
| 2 | 154 |
| 3 | 182 |
| 4 | 210 |
| 6 | 259 |
| 8 | 257 |

结果显示，反应 6 小时，产生了 259 g/L 的 D-阿洛酮糖，转化率约为 37%。

**[0069]** 实施例 9：通过固定化酶生产 D-阿洛酮糖

为了研究该生产 D-阿洛酮糖方法的效率，对该 3-差向异构酶进行了固定化。测量了固定化的 3-差向异构酶生产产量，将其与未固定的（游离的）3-差向异构酶的生产产量进行比较。

**[0070]** 对于固定在载体上的 3-差向异构酶，使用了 3-差向异构酶-海藻酸钠复合体球，该小球是通过如下方法制备的：将 3-差向异构酶溶液加入到 2.5% (w/v)的海藻酸钠溶液中，所述海藻酸钠溶液的体积是所述 3-差向异构酶溶液体积的 1.5 倍，再利用注射器泵和真空泵将该混合物加入到 0.2M 钙离子溶液中。

**[0071]** 除了使用了固定的 3-差向异构酶之外，该反应以与实施例 7 中相同的方式进行。该反应中所用的 3-差向异构酶的量为 10 U/mL，并测量了 D-阿洛酮糖生产率。其结果显示在下表 4 中。

**[0072]** 表 4

| 反应时间（小时） | D-阿洛酮糖(g/L) |
|---|---|
| 1 | 89 |
| 2 | 141 |

| | |
|---|---|
| 3 | 165 |
| 4 | 190 |
| 6 | 231 |
| 8 | 258 |
| 10 | 260 |

结果显示，固定化的 3-差向异构酶在反应 8 小时后达到最大产量 258 g/ L，转化率约为 37%，比游离的 3-差向异构酶反应速度稍慢，但是固定化的 3-差向异构酶更利于连续化生产，实现 D-阿洛酮糖的高效生产。

**[0073]** 实施例 10：D-阿洛酮糖在生物反应器中的生产产量

以下反应在生物反应器中进行，从而检验实施例 9 的固定化的 3-差向异构酶生产产量。

**[0074]** 首先，该固定化的 3-差向异构酶和果糖以与实施例 9 中相同的方式制备，将果糖加入到该固定化的 3-差向异构酶中，并将该混合物调节为体积 100mL 随后，将高 100cm 和直径 2.6cm 的生物反应器中充满所述固定化的 3-差向异构酶和果糖的混合物，且该反应在流速 10 mL/h 和 60 ℃条件下进行。所用的 3-差向异构酶的量为 500U，且所用果糖的浓度限制为 600g/L，这归因于长时间操作过程中过量果糖的沉淀问题。其结果显示在下表 5 中。

**[0075]** 表 5

| 时间（天） | 1 | 2 | 3 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D-阿洛酮糖生产率（g/L） | 189 | 222 | 219 | 221 | 220 | 222 | 219 | 221 | 220 |

结果显示，3-差向异构酶和果糖间的反应在整个 30 天的试验周期中是稳定的，从果糖向 D-阿洛酮糖的转化率为 37%，产物 D-阿洛酮糖浓度为 220 g/L。其产量能够满足糖类大规模生产的需要。

**[0076]** 因此，本发明能够提供利用生物反应器的 D-阿洛酮糖生产系统，所述生物反应器能够进行工业规模的大规模生产。

**[0077]** 实施例 11：利用 3-差向异构酶所转化山梨糖生产 D-塔格糖的转化率

在实施例 11 中，该 3-差向异构酶的反应在 pH7.5 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，温度范围 40-90℃条件下进行 12 小时，从而容许该反应充分地进行，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有该 3-差向异构酶 0.04 U/mL，1 mM 的钴离子，和 10%的山梨糖。然后，通过在 100℃加热 15 分钟来终止该反应，并测量样品中山梨糖和 D-塔格糖的含量。其结果在图 5 中所说明。

**[0078]** 结果显示在 12 小时后该 3-差向异构酶转化山梨糖生产 D-塔格糖的转化率在 90℃时转

化率最高，为 36%，50℃时转化率最低，为 29%，而在 60 ℃时转化率为 34%。

**[0079]** 实施例 12：利用 3-差向异构酶生产 D-塔格糖

为了生产高浓度的 D-塔格糖，该反应在 pH7.5 50 mM 的磷酸钠缓冲溶液中，60 ℃条件下进行反应，其中所述磷酸钠缓冲溶液含有 20 U/mL 的该 3-差向异构酶，1 mM 的钴离子和 500g/L 的山梨糖。然后在不同反应时间点取样，通过在 100 ℃加热 15 分钟终止该反应，并测量样品中 D-塔格糖的浓度。不同反应时间的 D-塔格糖产量显示在下表 6 中。

**[0080]** 表 6

| 反应时间（小时） | D-塔格糖(g/L) |
|---|---|
| 1 | 65 |
| 2 | 101 |
| 3 | 120 |
| 4 | 139 |
| 6 | 171 |
| 8 | 170 |

结果显示，反应 8 小时，产生了 171 g/L 的 D-塔格糖，转化率约为 34%。

**[0081]** 实施例 13：通过固定化酶生产 D-塔格糖

为了研究该生产 D-塔格糖方法的效率，对该 3-差向异构酶进行了固定化。测量了固 3 定化的 3-差向异构酶生产产量，将其与未固定的（游离的）3-差向异构酶的生产产量进行比较。

**[0082]** 对于固定在载体上的 3-差向异构酶，使用了 3-差向异构酶-海藻酸钠复合体球，该小球是通过如下方法制备的：将 3-差向异构酶溶液加入到 2.5% (w/v)的海藻酸钠溶液中，所述海藻酸钠溶液的体积是所述 3-差向异构酶溶液体积的 1.5 倍，再利用注射器泵和真空泵将该混合物加入到 0.2M 钙离子溶液中。

**[0083]** 除了使用了固定的 3-差向异构酶之外，该反应以与实施例 12 中相同的方式进行。该反应中所用的 3-差向异构酶的量为 20 U/mL，并测量了 D-塔格糖生产率。其结果显示在下表 7 中。

**[0084]** 表 7

| 反应时间（小时） | D-塔格糖(g/L) |
|---|---|
| 1 | 59 |
| 2 | 95 |
| 3 | 108 |
| 4 | 125 |
| 6 | 153 |
| 8 | 170 |
| 10 | 171 |

结果显示，固定化的 3-差向异构酶在反应 10 小时后达到最大产量 170g/ L，转化率约为 34%，与游离的 3-差向异构酶相比反应速度稍慢，但是固定化的 3-差向异构酶更利于连续化生产，实现 D-塔格糖的高效生产。

**[0085]** 实施例 14：D-塔格糖在生物反应器中的生产产量

以下反应在生物反应器中进行，从而检验实施例 13 的固定化的 3-差向异构酶生产产量。

**[0086]** 首先，该固定化的 3-差向异构酶和山梨糖以与实施例 13 中相同的方式制备，将山梨糖加入到该固定化的 3-差向异构酶中，并将该混合物调节为体积 100mL 随后，将高 100 cm 和直径 2.6 cm 的生物反应器中充满所述固定化的 3-差向异构酶和山梨糖的混合物，且该反应在流速 10 mL/h 和 60 ℃条件下进行。所用的 3-差向异构酶的量为 400 U，且所用山梨糖的浓度为 400 g/L。其结果显示在下表 8 中。

**[0087]** 表 8

| 时间（天） | 1 | 2 | 3 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D-塔格糖生产率（g/L） | 115 | 135 | 136 | 136 | 137 | 135 | 137 | 135 | 136 |

结果显示，3-差向异构酶和山梨糖间的反应在整个 30 天的试验周期中是稳定的，从山梨糖向 D-塔格糖的转化率为 34%，产物 D-塔格糖浓度为 170 g/L。其产量能够满足糖类大规模生产的需要。

**[0088]** 因此，本发明能够提供利用生物反应器的 D-塔格糖生产系统，所述生物反应器能够进行工业规模的大规模生产。

# 权利要求书

**1.** 一种新型 3-差向异构酶，其选自下组：

(a)多肽或蛋白质，其氨基酸序列与 SEQ ID No：2 具有至少 70%，例如至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或甚至 100%序列同一性；

(b)多肽或蛋白质，其由多核苷酸编码，所述多核苷酸在中等-高严格条件下与以下杂交：(i)SEQ ID No：1 的多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID No：1 的多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的全长互补链；

(c)多肽或蛋白质，其由多核苷酸编码，所述多核苷酸与 SEQ ID NO：1 的多肽编码序列具有至少 70%，例如至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或甚至 100%序列同一性；

(d)SEQ ID NO：2 的多肽或蛋白质包含一个或多个（几个）氨基酸的取代、缺失和/或插入的变体；

(e)任何(a)、(b)或(c)的多肽或蛋白质，其氨基酸序列包含 SEQ ID No：2 或由 SEQ ID No：2 组成，和

(f)(a)，(b)，(c)，(d)，或(e)的多肽或蛋白质的片段，其具有 3-差向异构酶活性。

**2.** 权利要求 1 的分离的多肽或蛋白质，其与 SEQ ID No：2 的多肽或蛋白质的氨基酸序列具有至少 70%，例如至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或甚至 100%序列同一性。

**3.** 权利要求 1 或 2 任一项的分离的多肽或蛋白质，其包含 SEQ ID No：2 或由 SEQID No：2 组成。

**4.** 一种分离的多核苷酸，其编码权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质。

**5.** 一种核酸构建体或表达载体，其包含权利要求 4 的多核苷酸，所述多核苷酸可操作地连接于一个或多个（几个）调控序列，所述调控序列指导所述多肽或蛋白质在表达载体中的产生。

**6.** 一种重组宿主细胞，其包含权利要求 4 的多核苷酸，所述多核苷酸可操作地连接于一个或多个调控序列，所述调控序列指导所述多肽或蛋白质的产生。

**7.** 一种产生权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质的方法，其包括：

(a)在有助于所述多肽或蛋白质的产生的条件下培养细胞，其以其野生型形式产生所述多肽或蛋白质；

和

(b)回收所述多肽或蛋白质。

**8.** 一种产生权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质的方法，其包括：

(a)在有助于所述多肽或蛋白质的产生的条件下培养权利要求 6 的宿主细胞；和

(b)回收所述多肽或蛋白质。

**9.** 一种组合物，其包含权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质和其它酶。

**10.** 权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质或权利要求 9 的组合物在用于生产 D-阿洛酮糖的工艺中的用途。

**11.** 权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质或权利要求 9 的组合物在用于生产 D-塔格糖的工艺中的用途。

**12.** 一种用于生产 D-阿洛酮糖的方法，其包括将果糖、葡萄糖及淀粉糖等混合糖与权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质的水性溶液相接触生产 D-阿洛酮糖。

**13.** 一种用于生产 D-塔格糖的方法，其包括将山梨糖及淀粉糖等混合糖与权利要求 1 至 3 任一项的多肽或蛋白质的水性溶液相接触生产 D-塔格糖。

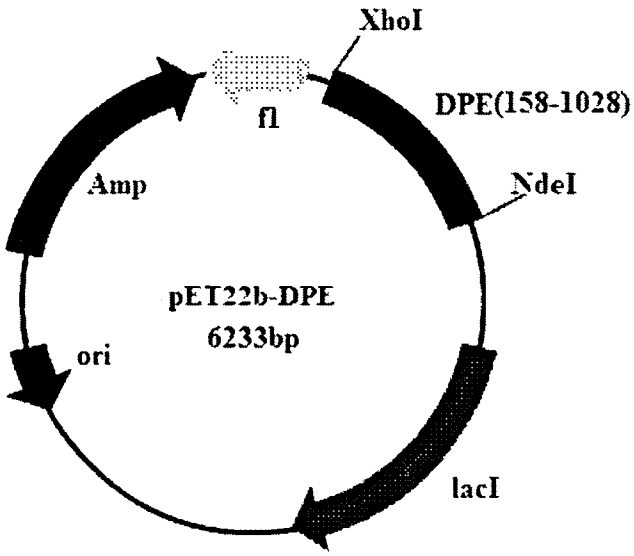

XhoI
DPE(158-1028)
NdeI
lacI
ori
Amp
f1
pET22b-DPE
6233bp

图 1

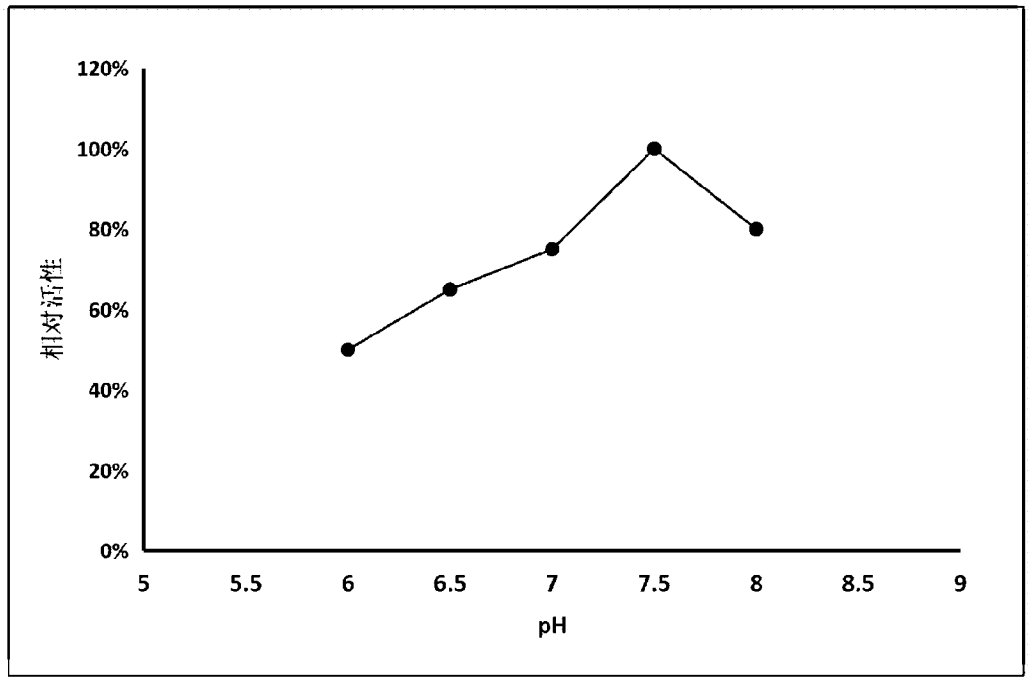

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
相对活性
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
8.5
9
pH

图 2-1

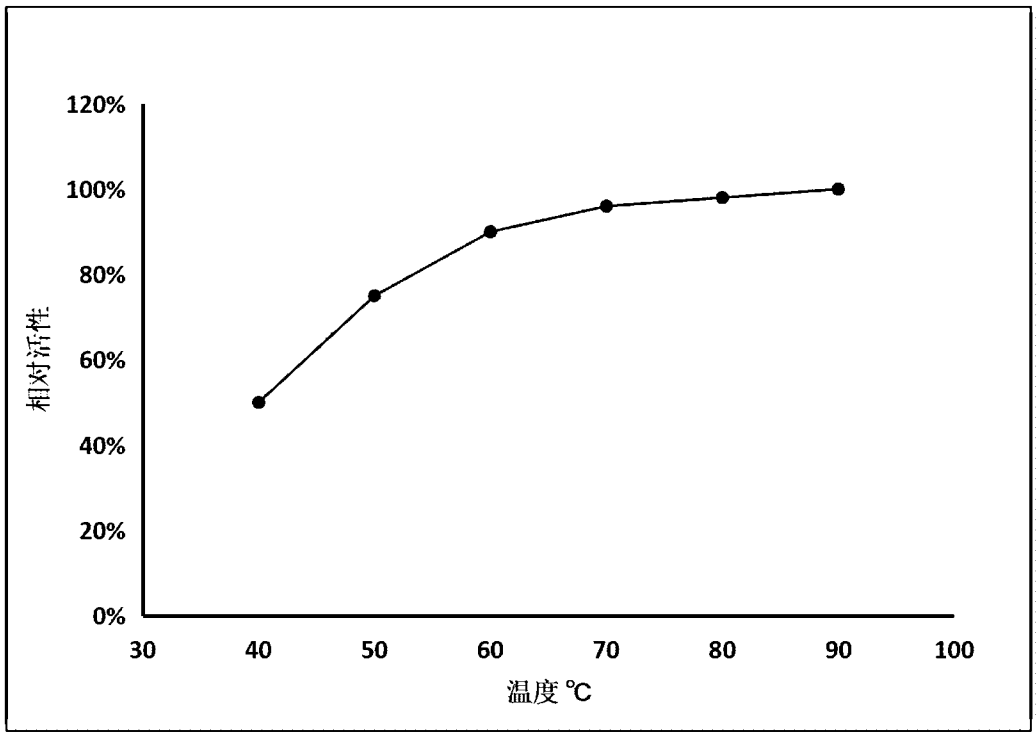

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
相对活性
30
40
50
60
70
80
90
100
温度℃

图 2-2

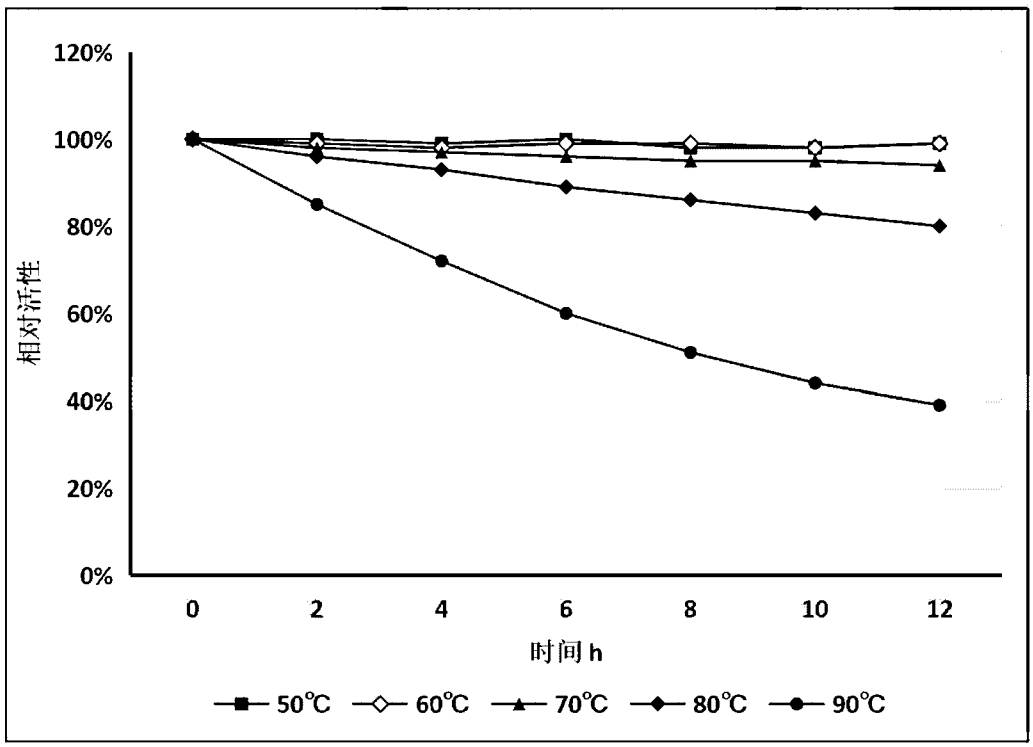

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
相对活性
0
2
4
6
8
10
12
时间 h
50℃
60℃
70℃
80℃
90℃

图 3

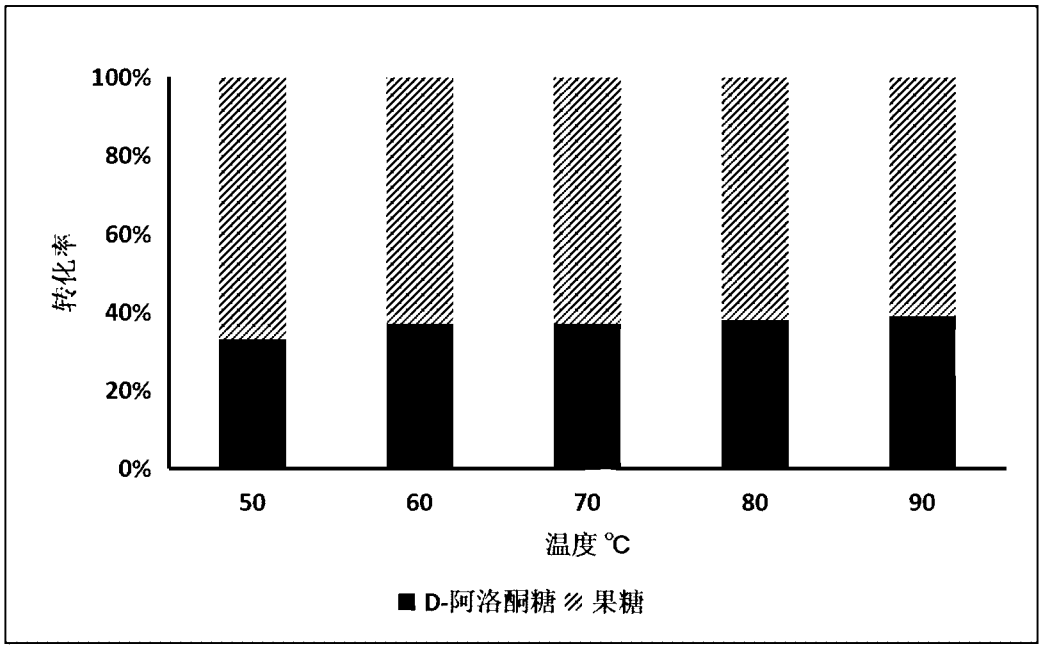

100%
80%
60%
40%
20%
0%
转化率
50
60
70
80
90
温度 ℃
D-阿洛酮糖 果糖

图 4

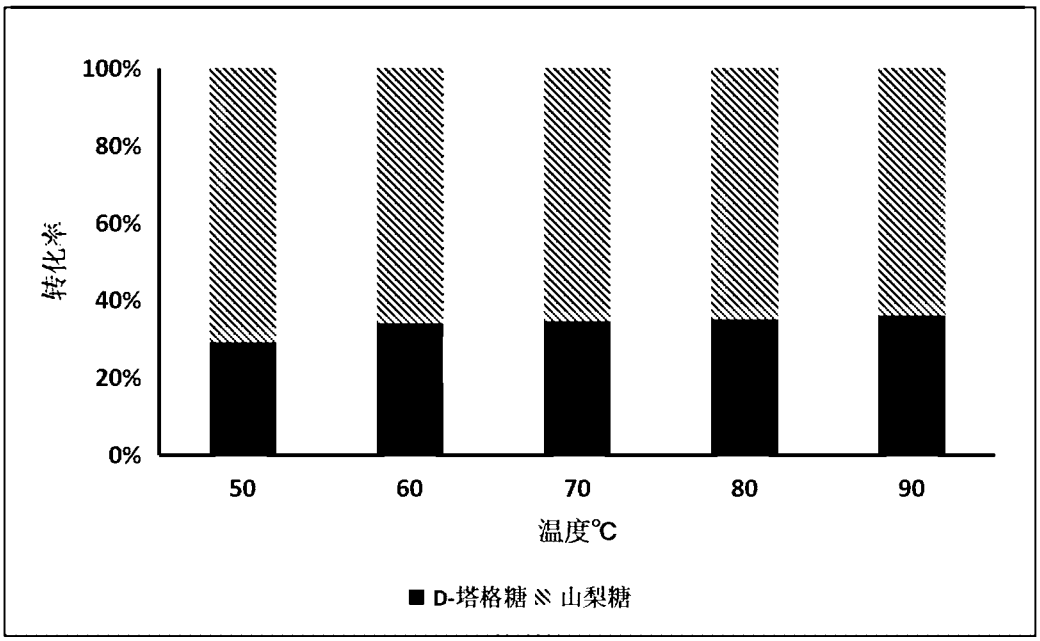

100%
80%
60%
40%
20%
0%
转化率
50
60
70
80
90
温度℃
D-塔格糖 山梨糖

图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2017/078923**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 9/90 (2006.01) i; C12N 15/61 (2006.01) i; C12P 19/24 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNABS, CPRSABS, CNMED, TWABS, TWMED, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Genbank+EMBL, National Bio-sequence Database of Chinese Patent: WANG, Sanyong; LI, Chunrong; HAN, Shilei; YAN, Ming; WEI, Miao; CHEN, Sheng; ZHANG, Zhilin;

3-epimerase, D-allulose, D-psicose, D-Tagatose, Thermogemmatispora carboxidivorans, sequence search on SEQ ID NOs: 1 and 2

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| PX | CN 105821027 A (TIANJIN LANGNAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 03 August 2016 (03.08.2016), see claims 1-14 | 1-13 |
| X | GenBanK, "Registry Number: WP_052889376", GenBanK Database, 20 August 2015 (20.08.2015), see the amino acid sequence | 1-3 |
| Y | GenBank, "Registry Number: WP_052889376", GenBanK Database, 20 August 2015 (20.08.2015), see the amino acid sequence | 4-13 |
| Y | CN 101189332 A (CJ CHEILJEDANG CORP.), 28 May 2008 (28.05.2008), see claims 1-9 | 4-10, 12 |
| Y | CN 103131721 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY), 05 June 2013 (05.06.2013), see claims 1-9, and description, paragraph 5 | 11, 13 |
| Y | CN 104160023 A (CJ CHEILJEDANG CORP.), 19 November 2014 (19.11.2014), see claims 1-8 | 4-10, 12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 12 June 2017 (12.06.2017) | **28 June 2017 (28.06.2017)** |
| Name and mailing address of the ISA/CN:<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No.: (86-10) 62019451 | Authorized officer<br>**XING, Yunlong**<br>Telephone No.: (86-10) **62411094** |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2017/078923**

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CN 103710330 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 09 April 2014 (09.04.2014), see claims 1-5 | 4-10, 12 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
**PCT/CN2017/078923**

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| CN 105821027 A | 03 August 2016 | None | |
| CN 101189332 A | 28 May 2008 | EP 1885850 A1 | 13 February 2008 |
| | | DE 602006012827 D1 | 22 April 2010 |
| | | CN 101189332 B | 16 February 2011 |
| | | WO 2006129954 A1 | 07 December 2006 |
| | | KR 100744479 B1 | 01 August 2007 |
| | | EP 1885850 B1 | 10 March 2010 |
| | | JP 4648975 B2 | 09 March 2011 |
| | | AT 460477 T | 15 March 2010 |
| | | ES 2339278 T3 | 18 May 2010 |
| | | US 2010190225 A1 | 29 July 2010 |
| | | KR 20060125971 A | 07 December 2006 |
| | | EP 1885850 A4 | 18 June 2008 |
| | | JP 2008541753 A | 27 November 2008 |
| | | PT 1885850 E | 29 April 2010 |
| | | US 8030035 B2 | 04 October 2011 |
| | | DK 1885850 T3 | 10 May 2010 |
| CN 103131721 A | 05 June 2013 | CN 103131721 B | 29 October 2014 |
| CN 104160023 A | 19 November 2014 | US 2014199732 A1 | 17 July 2014 |
| | | WO 2013027999 A9 | 11 July 2013 |
| | | EP 2749645 A4 | 10 June 2015 |
| | | JP 6043354 B2 | 14 December 2016 |
| | | WO 2013027999 A2 | 28 February 2013 |
| | | EP 2749645 A2 | 02 July 2014 |
| | | KR 101203856 B1 | 21 November 2012 |
| | | WO 2013027999 A3 | 10 May 2013 |
| | | US 9217166 B2 | 22 December 2015 |
| | | IN 1614CHN2014 A | 08 May 2015 |
| | | JP 2014525244 A | 29 September 2014 |
| | | CN 104160023 B | 29 March 2017 |
| | | EP 2749645 B1 | 26 April 2017 |
| CN 103710330 A | 09 April 2014 | CN 103710330 B | 22 April 2015 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/078923

A. 主题的分类

C12N 9/90(2006.01)i；C12N 15/61(2006.01)i；C12P 19/24(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N，C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：CNABS，CPRSABS，CNMED，TWABS，TWMED，HKABS，MOABS，DWPI，SIPOABS，CNTXT，TWTXT，WOTXT，USTXT，EPTXT，JPTXT，CNKI，Web of Science，Genbank＋EMBL，中国专利生物序列检索系统；王三永，李春荣，韩诗蕾，严明，魏淼，陈圣，章志林，3-差向异构酶，D-阿洛酮糖，D-塔格糖，3-epimerase，D-allulose，D-psicose，D-Tagatose，Thermogemmatispora carboxidivorans，对SEQ ID NOs：1、2的序列检索

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| PX | CN 105821027 A (南京朗奈生物技术有限公司) 2016年 8月 3日 (2016-08-03)<br>参见权利要求1-14 | 1-13 |
| X | GenBankK. "登录号：WP_052889376"<br>GenBank数据库, 2015年 8月 20日 (2015-08-20),<br>参见氨基酸序列 | 1-3 |
| Y | GenBank. "登录号：WP_052889376"<br>GenBank数据库, 2015年 8月 20日 (2015-08-20),<br>参见氨基酸序列 | 4-13 |
| Y | CN 101189332 A (CJ第一制糖株式会社) 2008年 5月 28日 (2008-05-28)<br>参见权利要求1-9 | 4-10、12 |
| Y | CN 103131721 A (天津工业生物技术研究所) 2013年 6月 5日 (2013-06-05)<br>参见权利要求1-9，说明书第5段 | 11、13 |
| Y | CN 104160023 A (CJ第一制糖株式会社) 2014年 11月 19日 (2014-11-19)<br>参见权利要求1-8 | 4-10、12 |

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 2017年 6月 12日 | 2017年 6月 28日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451 | 受权官员<br>邢云龙<br>电话号码 (86-10)62411094 |

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/078923

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
| --- | --- | --- |
| Y | CN 103710330 A (江南大学) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09)<br>参见权利要求1-5 | 4-10、12 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/078923

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CN | 105821027 | A | 2016年 8月 3日 | 无 | | | |
| CN | 101189332 | A | 2008年 5月 28日 | EP | 1885850 | A1 | 2008年 2月 13日 |
| | | | | DE | 602006012827 | D1 | 2010年 4月 22日 |
| | | | | CN | 101189332 | B | 2011年 2月 16日 |
| | | | | WO | 2006129954 | A1 | 2006年 12月 7日 |
| | | | | KR | 100744479 | B1 | 2007年 8月 1日 |
| | | | | EP | 1885850 | B1 | 2010年 3月 10日 |
| | | | | JP | 4648975 | B2 | 2011年 3月 9日 |
| | | | | AT | 460477 | T | 2010年 3月 15日 |
| | | | | ES | 2339278 | T3 | 2010年 5月 18日 |
| | | | | US | 2010190225 | A1 | 2010年 7月 29日 |
| | | | | KR | 20060125971 | A | 2006年 12月 7日 |
| | | | | EP | 1885850 | A4 | 2008年 6月 18日 |
| | | | | JP | 2008541753 | A | 2008年 11月 27日 |
| | | | | PT | 1885850 | E | 2010年 4月 29日 |
| | | | | US | 8030035 | B2 | 2011年 10月 4日 |
| | | | | DK | 1885850 | T3 | 2010年 5月 10日 |
| CN | 103131721 | A | 2013年 6月 5日 | CN | 103131721 | B | 2014年 10月 29日 |
| CN | 104160023 | A | 2014年 11月 19日 | US | 2014199732 | A1 | 2014年 7月 17日 |
| | | | | WO | 2013027999 | A9 | 2013年 7月 11日 |
| | | | | EP | 2749645 | A4 | 2015年 6月 10日 |
| | | | | JP | 6043354 | B2 | 2016年 12月 14日 |
| | | | | WO | 2013027999 | A2 | 2013年 2月 28日 |
| | | | | EP | 2749645 | A2 | 2014年 7月 2日 |
| | | | | KR | 101203856 | B1 | 2012年 11月 21日 |
| | | | | WO | 2013027999 | A3 | 2013年 5月 10日 |
| | | | | US | 9217166 | B2 | 2015年 12月 22日 |
| | | | | IN | 1614CHN2014 | A | 2015年 5月 8日 |
| | | | | JP | 2014525244 | A | 2014年 9月 29日 |
| | | | | CN | 104160023 | B | 2017年 3月 29日 |
| | | | | EP | 2749645 | B1 | 2017年 4月 26日 |
| CN | 103710330 | A | 2014年 4月 9日 | CN | 103710330 | B | 2015年 4月 22日 |