

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 384**

51 Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2016 PCT/US2016/024217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16160573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2016 E 16773840 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3274451**

54 Título: **Conversión de fructosa en alulosa mediante una enzima de Burkholderia**

30 Prioridad:

27.03.2015 US 201562139072 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2025

73 Titular/es:

**ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY
(100.00%)**

**4666 Faries Parkway
Decatur, Illinois 62526, US**

72 Inventor/es:

VENKITASUBRAMANIAN, PADMESH

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 010 384 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

Conversión de fructosa en alulosa mediante una enzima de *Burkholderia*

Antecedentes de la invención

- 5 La D-alulosa es el epímero C-3 de la D-fructosa y es un edulcorante de bajo contenido calórico. La alulosa, también conocida como D-psicosa, es muy similar a la glucosa en cuanto a intensidad y dulzor. Sin embargo, como el organismo metaboliza la alulosa de forma diferente a la mayoría de los azúcares, tales como la glucosa y la fructosa, su valor calórico es significativamente inferior. De hecho, su valor calórico es casi nulo. Al igual que la glucosa, la D-alulosa tiene aproximadamente el 70 % del dulzor relativo de la sacarosa, pero sólo aporta 0,2 kcal/mol de energía.
- 10 La bioconversión de D-fructosa en D-alulosa por la D-tagatosa-3-epimerasa (DT3E) o por la D-psicosa-3-epimerasa (figura 1) ha sido reconocida desde hace tiempo, aunque los procedimientos de producción solían tener un alto coste de producción. La conversión de D-fructosa en D-alulosa diversificará la cartera de productos edulcorantes tradicionales asociados al procesamiento del maíz, añadiendo un edulcorante natural bajo en calorías y un agente de carga a la cartera tradicional de edulcorantes derivados del almidón de maíz, es decir, jarabe de maíz, jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF), glucosa y fructosa.
- 15 La solicitud de patente de EE. UU. nº 20150210996 (Woodyer *et al.*) divulga una enzima del microorganismo del suelo *Desmospora sp.* que tiene actividad psicosa-3-epimerasa. Se ha demostrado que esta enzima convierte la D-fructosa en D-alulosa (también conocida como D-psicosa).
- La patente de EE. UU. 8 030 035 y el documento WO2011/040708 divulgan una enzima derivada de *Agrobacterium tumefaciens* que tiene actividad psicosa-3-epimerasa.
- 20 Chan *et al.* (Protein Cell, febrero de 2012, 3(2):123-131, "Crystal structures of D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10 and its complex ketohexose sugars" también divulga una enzima que puede epimerizar la D-fructosa para producir D-psicosa.
- 25 Sigue existiendo la necesidad en la técnica de descubrir otros genes que expresen actividad psicosa-3-epimerasa para mejorar la eficiencia de la conversión de fructosa en alulosa de una manera rentable. La presente invención da a conocer una nueva clase de psicosa-3-epimasas de la betaproteobacteria *Burkholderia* que es un simbiote que se encuentra el intestino medio posterior del insecto de la judía *Riptortus pedestris*. Se cree que este microorganismo simbiótico es crucial para la supervivencia y reproducción del hospedador y desempeña un papel fundamental en el metabolismo del hospedador al proporcionar nutrientes esenciales, digerir materiales alimenticios y/o influir en el uso de las plantas del hospedador, la resistencia contra los parasitoides y el cambio de color del cuerpo. Una vez
- 30 identificado y aislado, un gen ilustrativo de la psicosa-3-epimasa procedente de una cepa RPE64 de *Burkholderia sp.* se expresó en una cepa de producción de *E. coli* y la enzima se aisló y evaluó tanto en entornos de producción de trabajo como a escala piloto. La enzima se evaluó para la producción comercial de alulosa mediante la inmovilización de la enzima sobre una resina de intercambio aniónico de base débil y matriz sólida, como se describe con más detalle en el presente documento.
- 35 El documento WO 2015/ 032761 se refiere a la D-psicosa-epimerasa y a procedimientos para su uso en la preparación de psicosa a partir de fructosa. Divulga una D-psicosa-3-epimerasa de *P. cichorii* que es idéntica en un 88,3 % a SEQ ID NO:1 divulgada en el presente documento. El número de registro de Gen Bank BAN26336.1 divulga una secuencia de *Burkholderia* RP64 que es idéntica a SEQ ID NO:1 divulgada en el presente documento.

Sumario de la invención

- 40 La presente invención describe un procedimiento de producción de alulosa que comprende poner en contacto una solución que contiene fructosa con una enzima psicosa-3-epimerasa de una especie de *Burkholderia* que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12 durante un tiempo y en condiciones adecuadas para convertir al menos una parte de la fructosa en alulosa. Determinadas realizaciones incluyen un procedimiento en el que la psicosa-3-epimerasa se inmoviliza sobre una resina de matriz sólida y se utiliza para convertir la fructosa en alulosa, preferentemente a temperaturas entre 50 °C y 70 °C. Las realizaciones preferidas incluyen un procedimiento en el que la matriz sólida es una resina de intercambio aniónico de base débil.
- 45 Los ejemplos de realizaciones de la invención incluyen un procedimiento en el que la resina de matriz sólida es una resina condensada a base de fenol formaldehído funcionalizada para contener grupos de base libre de amina terciaria, ilustrada por DUOLITE™ A568. Otros ejemplos de realizaciones de la invención incluyen un procedimiento en el que la resina de matriz sólida es una resina a base de ácido metacrílico funcionalizada para contener enlaces amina C2-C6, tal como Lifetech™ ECR8315, Lifetech™ ECR 8415 y SEPABEADS™ EC-HA.
- 50 Otras realizaciones de la invención incluyen un procedimiento en el que la solución de fructosa se selecciona de fructosa cristalina solubilizada y jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF). Las realizaciones preferidas de la invención incluyen un procedimiento en el que la solución de fructosa tiene un contenido de sólidos disueltos de aproximadamente el 50 % p/p, el contacto se realiza en un intervalo de pH de 6,5-7,7 en presencia de magnesio con
- 55

una concentración de 24-50 ppm (correspondiente a 24-50 mg/ñ), y se realiza con un caudal de 1-4 volúmenes de solución de fructosa por volumen de lecho de la resina de matriz sólida.

Otras realizaciones de la invención incluyen un procedimiento en el que la enzima psicosa-3-epimerasa se obtiene a partir de un microorganismo que contiene un vector de ácido nucleico recombinante configurado operativamente para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12. Las realizaciones preferidas de la invención incluyen un procedimiento en el que el microorganismo es *E. coli* y *B. subtilis*.

Otro aspecto de la invención es una secuencia de ácido nucleico recombinante configurada operativamente para expresar un ácido nucleico que codifica la enzima psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:12.

Otro aspecto de la invención es un microorganismo transformado con una secuencia de ácido nucleico recombinante configurada operativamente para expresar un ácido nucleico que codifica la psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12. Las realizaciones preferidas de la invención incluyen un microorganismo seleccionado entre *E. coli* y *B. subtilis*.

Otros aspectos de la invención incluyen una resina de matriz sólida que contiene una enzima psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12. Otros aspectos de la invención incluyen una columna que contiene la resina de matriz sólida que contiene una enzima psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12; y, configurada para recibir un flujo de entrada de una solución para que fluya sobre la resina de matriz sólida y permitir la salida de un flujo de salida de la solución.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la bioconversión de D-fructosa en D-alulosa.

La figura 2 muestra un mapa de vectores del casete genético BRPV3 de *Burkholderia sp. RPE64* insertado en el vector de expresión pET-22b(+).

La figura 3 muestra la evaluación de la enzima psicosa-3-epimerasa en un lisado acelular.

La figura 4 muestra los resultados del ejemplo 1 en un gel de SDS PAGE que analiza diferentes fracciones tras la purificación a pequeña escala.

La figura 5 muestra los resultados de la expresión y purificación a gran escala de la psicosa-3-epimerasa en un gel de SDS PAGE que analiza una fracción diferente después de la purificación, tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 6 muestra la evaluación de la termoestabilidad de la enzima psicosa-3-epimerasa, tal como se describe en el ejemplo 3.

La figura 7 muestra la bioconversión de fructosa en alulosa catalizada por la cepa pBRPV3 a 70 °C, tal como se describe en el ejemplo 3.

La figura 8 muestra la actividad específica de la enzima durante la fermentación a escala piloto, tal como se describe en el ejemplo 6.

La figura 9 muestra una secuencia de proteína de SEQ ID NO:1 que es el gen de la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* RPE64.

La figura 10 muestra una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 que codifica la secuencia de proteína de SEQ ID NO:1.

La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador 5' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:10 y para añadir el sitio de restricción NdeI con fines de clonación para construir p-3-13_pET-22b(+) (SEQ ID NO:3).

La figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador 3' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:10 y añadir el sitio de restricción XhoI con fines de clonación para construir p-3-13_pET-22b(+) y un codón de terminación (SEQ ID NO:4).

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador utilizado para amplificar el gen *thrC* y para añadir el sitio de restricción DraIII con fines de clonación para crear la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*thrC*- (SEQ ID NO:5).

- La figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador utilizado para amplificar el gen *thrC* y para añadir el sitio de restricción DraI con fines de clonación para crear la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*thrC*- (SEQ ID NO:6).
- 5 La figura 15 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:7) del casete que se amplificó para integrarse en el cromosoma y crear ASR182.
- La figura 16 muestra la SEQ ID NO:8, la secuencia de nucleótidos del cebador 5' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:7.
- La figura 17 muestra la SEQ ID NO:9, la secuencia de nucleótidos del cebador 3' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:7.
- 10 La figura 18 muestra la producción de psicosa-3-epimerasa por ASR180 durante la fermentación, tal como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 19 muestra la inmovilización de un lisado bruto procedente de la fermentación a escala piloto de ASR180 sobre la resina DUOLITE™.
- 15 La figura 20 muestra la conversión de fructosa en alulosa usando la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* sp. REP4 inmovilizada sobre la resina DUOLITE™, tal como se describe en el ejemplo 7.
- La figura 21 muestra la conversión de fructosa en alulosa utilizando la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* sp. REP4 inmovilizada sobre la resina Lifetech™ ECR8415, tal como se observa en el ejemplo 8.
- La figura 22 muestra los resultados del ensayo enzimático, tal como se describe en el ejemplo 9.
- 20 La figura 23 muestra un plásmido vector p-3-13_pET-22b(+)*thrC*. Este se utilizó para crear la cepa de producción ASR180.
- La figura 24 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:10) que codifica las secuencias de proteínas según SEQ ID NO:1 con la excepción de un sitio de restricción NdeI adicional en el extremo 5' y un sitio de restricción XhoI en el extremo 3'. Los sitios de restricción están resaltados en gris.
- 25 La figura 25 muestra la SEQ ID NO:11, que es la secuencia de proteína de la enzima tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii*.
- La figura 26 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:12.
- La figura 27 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:13.
- 30 La figura 28 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:14.
- La figura 29 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:15.
- 35 La figura 30 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:16.
- La figura 31 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:17.
- La figura 32 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:18.
- 40 La figura 33 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:19.
- La figura 34 muestra la secuencia de proteína para una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:20.
- 45 La figura 35 muestra la secuencia de proteína para una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:21.
- La figura 36 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:22.

La figura 37 muestra la secuencia de proteína para una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:23.

La figura 38 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:24.

5 La figura 39 muestra la secuencia de proteína de una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:25.

La figura 40 muestra la secuencia de proteína para una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia* según SEQ ID NO:26.

Lista de secuencias

- 10 SEQ ID NO:1 es el gen de la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* RPE64.
SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de proteína de SEQ ID NO:1.
SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos del cebador 5' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:10 y añadir el sitio de restricción NdeI con fines de clonación para construir p-3-13_pET-22b(+).
- 15 SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos del cebador 3' utilizado para amplificar SEQ ID NO:10 y añadir el sitio de restricción XhoI con fines de clonación para construir p-3-13_pET-22b(+) y un codón de terminación.
SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos del cebador utilizado para amplificar el gen *thrC* y añadir el sitio de restricción DraIII con fines de clonación para crear la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*thrC*-.
SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos del cebador utilizado para amplificar el gen *thrC* y añadir el sitio de restricción DraI con fines de clonación para crear la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*thrC*-.
20 SEQ ID NO:7 es la secuencia de nucleótidos del casete que se amplificó para integrarse en el cromosoma y crear ASR182.
SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos del cebador 5' utilizado para amplificar SEQ ID NO:7.
SEQ ID NO:9 es la secuencia de nucleótidos del cebador 3' utilizado para amplificar SEQ ID NO:7.
- 25 SEQ ID NO:10 es la secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias de proteínas según SEQ ID NO:1, con la excepción de un sitio de restricción NdeI adicional en el extremo 5' y un sitio de restricción XhoI en el extremo 3'. Los sitios de restricción están resaltados en gris.
SEQ ID NO:11 es la secuencia de proteína de la enzima tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii*.
SEQ ID NO:12 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:13 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
- 30 SEQ ID NO:14 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:15 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:16 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:17 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:18 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
- 35 SEQ ID NO:19 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:20 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:21 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:22 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:23 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
- 40 SEQ ID NO:24 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:25 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.
SEQ ID NO:26 es una secuencia de proteína de otra psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

Descripción detallada

La siguiente descripción y los antecedentes anteriores citan determinadas referencias que pueden ayudar a los expertos en la técnica a comprender la presente invención y pueden proporcionar material, información, técnicas, proteínas, vectores y secuencias de nucleótidos que pueden ayudar a los expertos en la técnica a llevar a cabo y utilizar aspectos de la presente invención en su alcance más completo.

Un aspecto de la presente invención es el descubrimiento de una clase de enzimas psicosa-3-epimerasa codificadas por genes procedentes del género betaproteobacteriano *Burkholderia*, que se ilustra en el presente documento con la SEQ ID NO:1, que es la secuencia de proteína de una psicosa-3-epimerasa de una cepa *Burkholderia sp* RPE 64 que es un simbionte que se encuentra en el intestino medio posterior del insecto de la judía *Riptortus pedestris*. En la tabla 1 se muestran otros ejemplos de genes de psicosa-3-epimerasa de esta clase, todos los cuales comparten al menos un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:1, todas las cuales difieren sustancialmente de otras psicosa-3-epimerasas divulgadas para su uso en la conversión de fructosa en alulosa, tales como las procedentes de *Clostridium sp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Desmospora sp.*, que se han descrito previamente en la técnica, y todas las cuales, excepto SEQ ID NO:12, no forman parte de la invención reivindicada. SEQ ID NO:1 sólo tiene un 42 % de identidad con la secuencia polipeptídica de *Desmospora sp* divulgada por Woodyer *et al.* Asimismo, la secuencia de *Clostridium cellulolyticum* descrita por Chan *et al.* tiene un 42 % de identidad con SEQ ID NO:1, y el polipéptido de *Agrobacterium tumefaciens* descrito en la patente de EE. UU. 8 030 035 y el documento WO2011/040708 solo mostró un 41 % de identidad con SEQ ID NO:1. Una excepción a esta regla es la epimerasa de *Pseudomonas cichorii* (SEQ ID NO:11) mostrada en la figura 10, que tiene un 88 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, pero que se excluye de la presente invención.

Tabla 1

Especies ilustrativas de psicosa-3-epimerasa de <i>Burkholderia</i>		
SEQ ID NO:	Especies de <i>Burkholderia</i> :	% de identidad
12	Candidato de <i>Burkholderia verschuerenii</i>	94
13	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	92*
14	<i>Burkholderia sp.</i>	91*
15	<i>Burkholderia sp.</i>	91*
16	<i>Burkholderia sp.</i> MR1	90*
17	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	92*
18	<i>Burkholderia grimmiae</i>	88*
19	desconocido	87*
20	<i>Burkholderia grimmiae</i>	88*
21	desconocido	85*
22	desconocido	84*
23	<i>Burkholderia sp.</i> MR1	89*
24	Candidato de <i>Burkholderia brachyanthoides</i>	89*
25	Candidato de <i>Burkholderia brachyanthoides</i>	88*
26	Candidato de <i>Burkholderia calva</i>	91*
* no forma parte de la invención reivindicada		

SEQ ID NO:1 se identificó en una base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el número de registro YP_008039310 y estaba etiquetada como un gen de la xilosa isomerasa. Antes de la presente invención, no se sabía que esta enzima tuviera una actividad psicosa-3-epimerasa capaz de isomerizar la fructosa en alulosa. Para determinar que la enzima ilustrativa de la presente invención mostraba actividad epimerasa, los presentes inventores hicieron sintetizar químicamente por GenScript (Biscataway, NJ) el gen que codifica la proteína identificada con el número de registro YP_008039310. El ADN sintético se creó para incluir sitios de restricción NdeI y XhoI en los extremos 5' y 3' del polinucleótido con el fin de garantizar una clonación sencilla. La secuencia de este polinucleótido sintetizado es conforme a SEQ ID NO:10 como se muestra en la figura 24 y se denomina en el presente documento casete del gen BRPV3. El casete BRPV3 se diseñó con los sitios de restricción NdeI y XhoI y se clonó en un vector de expresión digerido con NdeI/XhoI pET-22b+ obtenido de Novagen, Inc. (Madison, WI) para que el extremo N estuviera dentro de marco con una secuencia de marcador de polihistidina contenida en el vector. El vector de expresión resultante se denomina en el presente documento BRPV3_pET22b(+), y en la figura 2 se muestra un mapa del mismo.

El vector de expresión BRPV3_pET22b(+) se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Studier, F.W. y B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase was used to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol., 5 de mayo de 1986, 189(1):113-130). La cepa resultante de esta transformación se denomina en el presente documento BL21(DE3)/BRPV3.

Se seleccionaron colonias individuales y se incubaron durante la noche (30 °C, 250 rpm, 16 h) en 5 ml de caldo LB (Miller) (BD Biosciences, Inc.) con ampicilina 100 µg/µl (Sigma-Aldrich Corp.) para mantener los plásmidos. Transcurridas 16 h, se diluyeron 2 ml de cada cultivo al 1:100 en un matraz agitador con hendiduras que contenía 200 ml de LB (ampicilina 100 µg/µl) y se cultivó hasta que la DO_{600 nm} alcanzó aproximadamente 0,5 (30 °C, 250 rpm). A continuación, los cultivos se indujeron con una concentración final de 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG de Sigma-Aldrich Corp.) y se incubaron de nuevo durante 16 h. Las células se recolectaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm, 4 °C. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C.

Las células congeladas se descongelaron en hielo, se lisaron y se centrifugaron. El sobrenadante se utilizó para evaluar si el gen expresado podía catalizar la epimerización de fructosa en alulosa, lo que confirmó que la SEQ ID NO:1 codificaba de hecho una enzima con actividad de enzima epimerasa. Los resultados de este experimento pueden verse en la figura 3.

Aunque se demostró claramente que el plásmido BRPV3_pET-22(b)+ expresaba la enzima codificada en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)/BRPV3, en última instancia se deseaba una cepa sin marcadores de antibióticos. Para ello, se creó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*thrC*-, que es auxotrófica para la biosíntesis de treonina. BL21(DE3)*thrC*- se generó mediante la integración de un casete de antibiótico que delecióna *thrC* y la escisión del casete de antibiótico mediante las siguientes etapas. El gen *thrC* ya está alterado en un derivado de *E. coli* K-12 de la colección Keio (Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner y H. Mori, Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Mol. Syst. Biol., 2006, 2:2006.0008). En este derivado de *E. coli* K-12, un casete de kanamicina ha sustituido al gen nativo *thrC* y está flanqueado por secuencias de ADN reconocidas por la recombinasa FLP, una enzima capaz de escindir el casete. Se utilizó un lisado de fago P1 generado a partir de esta cepa *thrC*::km^R para transducir la resistencia a la kanamicina en BL21 (DE3). Los transductores se transformaron con un plásmido pCP20 resistente a la ampicilina y sensible a la temperatura (Cherepanov, P.P. y W. Wackemagel, Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, Gene, 158:9-1) para introducir transitoriamente la recombinasa FLP y se confirmó que los aislados sensibles a la kanamicina y la ampicilina eran auxótrofos para la biosíntesis de treonina.

Paralelamente, el plásmido BRPV3_pET-22(b)+ se usó como molde en una reacción de PCR en la que los cebadores mostrados en las figuras 10 y 11 (SEQ ID NO:2 y 3, respectivamente) se usaron para amplificar la secuencia polinucleotídica que expresa la actividad epimerasa. El producto de PCR amplificado y pET-22(b)+ se digirieron con las enzimas de restricción NdeI y XhoI y se ligaron para crear el plásmido p-3-13_pET-22(b)+. El cebador 3' (SEQ ID NO:3) contiene un codón de terminación cadena arriba del sitio de restricción XhoI, de modo que, una vez ligado, el marcador de His del vector de expresión pET-22(b)+ ya no está dentro de marco.

El plásmido p-3-13_pET-22b (+) se digirió con las enzimas de restricción DraI y DraIII NEB para eliminar todo el ADN codificante de resistencia a la ampicilina. El gen *thrC* de *E. coli* K-12 se amplificó con los cebadores de SEQ ID NO:4 y NO:5 (tal como se ve en las figuras 12 y 13) que añadían homología extendida a pET22b en los sitios de corte DraI y DraIII. La PCR y el plásmido digerido p-3-13_pET-22(b)+ se ensamblaron mediante una mezcla maestra de ensamblaje Gibson (NEB). El plásmido resultante, p-3-13_pET-22(b)+*thrC*, se transformó en BL21(DE3)*thrC*- y las colonias que aparecieron en medio mínimo M9 constituyen la cepa denominada en el presente documento ASR180. ASR180 es una cepa de *E. coli* que contiene el vector sin marcadores de resistencia a los antibióticos, como se indica en la figura 23.

Para construir ASR182, que es una cepa de *E. coli* con una copia del gen de la psicosa-3-epimerasa procedente de *Burkholderia* RPE64 integrado en el cromosoma, en Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) se fabricó un

casete de nucleótidos sintéticos según SEQ ID NO:7. El casete codifica funcionalmente un pequeño trozo de ADN homólogo cadena arriba del gen *thrC*, el gen *thrC*, un promotor T7, una secuencia que codifica la enzima según SEQ ID NO:1 y un pequeño trozo de ADN homólogo cadena abajo de *thrC*. Este casete se amplificó con Go Taq (Promega, Inc., Fitchburg, WI) utilizando cebadores IDT según SEQ ID NO:8 y 9 (figuras 16 y 17, respectivamente). El casete amplificado y el plásmido pKD46 (Datsenko, K.A. y B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 6 de junio de 2000, 97(12): 6640-6645) se introdujeron en la cepa BL21 (DE3)*thrC*-, descrita previamente en el presente documento. Como se describe con más detalle en Datsenko *et al.*, el plásmido pKD46 tiene un mecanismo de recombinación capaz de integrar el casete amplificado en el cromosoma de BL21(DE3)*thrC*-. El casete se integró en el cromosoma de BL21(DE3)*thrC*- mediante selección para la prototrofia en placas con medio mínimo M9. La cepa se curó de pKD46 por pasaje a 37 °C. Se caracterizaron los aislados protótrofos sensibles a la ampicilina y que expresaban la actividad enzimática deseada.

Aunque la enzima ilustrada en el presente documento se obtuvo por expresión de un vector que codifica la enzima en *E. coli*, los expertos en la técnica pueden sobreexpresar cualquiera de las enzimas psicosa-3-epimerasas en cualquier microorganismo adecuado, por ejemplo, *B. subtilis* es otra bacteria preferida para sobreexpresar enzimas.

Una vez construidas las cepas ASR180 y ASR182, se realizaron pequeñas fermentaciones de trabajo y grandes fermentaciones a escala piloto como se muestra en los siguientes ejemplos. El aislamiento de la enzima psicosa-3-epimerasa que se produjo a partir de estas fermentaciones se realizó mediante inmovilización sobre resinas de matriz sólida descritas con más detalle en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos y realizaciones no comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones se ofrecen a título ilustrativo.

Ejemplo 1: Producción a pequeña escala de BL21DE3/BRPV3.

Tras la construcción de la cepa BL21DE3/BRPV3, el cultivo se realizó obteniendo primero colonias individuales. Las colonias individuales seleccionadas se inocularon en 15 ml de medio LB con ampicilina (100 ug/ml) en un matraz de 50 ml. Los cultivos se incubaron con agitación a 250 rpm a 30 °C en agitadores giratorios New Brunswick Scientific G25. Se utilizó un inóculo al 1 % derivado de cultivos nocturnos de fase I para iniciar cultivos LB frescos (500 ml) con antibióticos en un matraz Fembach de 2,7 l. El cultivo se incubó a 30 °C durante 16 h con agitación a 250 rpm en un agitador giratorio. Cuando la densidad óptica fue de 0,9, se indujo la expresión de la proteína con IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM. Las células de *E. coli* se recolectaron mediante centrifugación a 5474 × g durante 6 min a 4 °C. Las células se lisaron y la enzima psicosa-3-epimerasa se purificó utilizando una columna de Ni-NTA. La proteína eluida se dializó con tampón Tris y se evaluó la actividad enzimática según el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

Los resultados de esta evaluación pueden verse en la figura 4, que es un gel de SDS PAGE que analiza diferentes fracciones después de la purificación a pequeña escala. El carril 1 son marcadores de peso molecular teñidos previamente, el carril 2 es lisado celular, el carril 3 es lisado celular eluido de la columna de níquel, el carril 4 es carga FT, el carril 5 es el lavado, el carril 6 es la fracción 1, el carril 7 es la fracción 2, el carril 8 es la fracción 3, el carril 9 es la fracción 4 y el carril 10 son restos celulares.

Ejemplo 2: Purificación a gran escala de la psicosa-3-epimerasa de BL21DE3/BRPV3

Se cultivó BL21(DE3)/BRPV3 en un fermentador Biostat® C-plus (Sartorius). Los cultivos de siembra se iniciaron inoculando 50 µl de solución madre de glicerol congelado en un matraz de 250 ml que contenía 60 ml de medio LB Lennox con ampicilina (100 ug/ml). El matraz se agitó a 30 °C, 250 rpm durante 16 h. Los cultivos de una noche se transfirieron a fermentadores Biostat® C-plus (Sartorius) que contenían 12 l de medio LB Lennox con ampicilina (100 ug/ml). El fermentador se mantuvo a 30 °C, 30 % de oxígeno disuelto y a pH 6,8 ± 0,1. El pH se ajustó con HCl 2 N o NaOH 5 N. Cuando el cultivo alcanzó una DO600 de 1, se indujo el cultivo con β-isopropil tiogalactósido (IPTG) (concentración final 0,5 mM). Tras una noche de cultivo, se detuvo la fermentación y se recogieron las células por centrifugación. Las células se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Las células congeladas se descongelaron y se suspendieron en 100 ml de tampón de lisis (Tris Cl 15 mM, imidiazol 10 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 2 mM, pH 7,5). Las células se lisaron utilizando un microfluidizador (1,24 kbares (18 000 psi)). El lisado celular se centrifugó a 15 000 g para separar los restos celulares. El sobrenadante se utilizó para la purificación posterior.

La enzima activa se purificó usando el sistema de FPLC AKTA explorer equipado con 40 ml de columna Ni-NTA. La columna se equilibró con el tampón de lisis y el sobrenadante se cargó en la columna a 6 ml/min. Una vez cargado todo el lisado celular, se lavó la columna con 5 volúmenes de lecho de tampón de lavado (Tris.Cl 15 mM, imidiazol 30 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 2 mM, pH 7,5) para separar el resto de proteínas no deseadas. A continuación, la columna Ni-NTA se lavó de nuevo con tampón de elución (Tris.Cl 15 mM, imidiazol 250 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 2 mM, pH 7,5) para eluir la enzima marcada con His de la columna. La fracción que contenía la enzima activa se agrupó, concentró y dializó con Tris Cl 15 mM, MnCl₂ 2 mM, glicerol al 50 %, pH 7,5. La enzima estabilizada se almacenó a 4

°C. La enzima purificada fue estable durante >2 años cuando se almacenaba en estas condiciones. Las fracciones que contenían enzimas se ensayaron en un gel de SDS PAGE y los resultados pueden verse en la figura 5. La actividad enzimática se evaluó según los procedimientos descritos en el ejemplo 3.

Ejemplo 3

- 5 La enzima psicosa-3-epimerasa purificada procedente de la fermentación descrita en los ejemplos 1 y 2 se evaluó mediante un ensayo de epimerasa realizado a 50 °C durante 5 min en tampón TrisCl 50 mM (pH 7,5) que contenía fructosa 200 mM y 40 ug de enzima purificada. La reacción se detuvo calentando a 105 °C durante 10 min. Una unidad de actividad D-psicosa 3-epimerasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 umol de psicosa por minuto a pH 7,5 y 50 °C.
- 10 La enzima purificada se diluyó 10 veces en tampón Tris 50 mM que contenía MnCl₂ 2 mM, pH 7,5. Esta solución se incubó a diferentes temperaturas (40-70 °C). En el momento adecuado tras la incubación a la temperatura deseada, se extrajo una parte alícuota de la muestra de enzima (50 l) y se evaluó la actividad residual. La enzima purificada mostró un nivel similar de actividad enzimática a todas las temperaturas ensayadas. Se observó que la enzima era catalíticamente activa tras incubarla a 70 °C durante 3 h. Estos resultados pueden verse en la figura 6. La
- 15 bioconversión de fructosa en alulosa a 70 °C también puede observarse en la figura 7.

Ejemplo 4: Inmovilización de la psicosa-3-epimerasa sobre resinas de matriz sólida.

- 20 El lisado celular procedente de BL21(DE3)/BRPV3 cultivado en las condiciones descritas en el ejemplo 1 se analizó para determinar la actividad epimerasa sobre varias resinas de soporte de inmovilización. Los resultados de la comparación de las resinas pueden verse en la tabla 2, que muestra la actividad de la presente enzima medida por análisis GC, que indican que las resinas de matriz sólida de base débil son el mejor soporte para inmovilizar esta enzima. La tabla 2 sugiere además que las resinas de intercambio aniónico fuertes, tales como Lifetech™ ECR1504, Lifetech™ ECR1640 y Lifetech™ ECR1604, no son las resinas de soporte más adecuadas para inmovilizar la enzima descrita en el presente documento.

- 25 Cuando hay dos números en una fila de la tabla 2, el número inferior en negrita indica la actividad enzimática medida por HPLC. Lo más importante es que la última columna indica que las resinas ECR8315F/M, ECR8415F/M y DUOLITE™ A568 muestran un porcentaje muy bajo de actividad que queda en el sobrenadante al pasar por la columna, lo que indica una alta capacidad de carga enzimática de estas resinas. ECR8315 F/M y ECR8415 F/M (Lifetech™) y DUOLITE™ A568 se identificaron como los soportes de inmovilización óptimos para esta enzima. SEPABEADS™ EC-HA, que también es una resina con amino modificada de base metacrílica (similar a ECR8415), también funcionará
- 30 para la inmovilización. Basándose en esto, se puede hipotetizar que esta psicosa-3-epimerasa tiene una alta afinidad por la resina modificada con amino y muestra una alta actividad de la psicosa-3-epimerasa sobre estas resinas una vez inmovilizada.

Tabla 2

	Portador	% de agua	g húmedo	U/g	U/g seco	% rec	% actividad en sobrenadante
1	Lifetech™ ECR8315F	78	1,13	300	1350	67	<1
2	Lifetech™ ECR8415F	78	1,13	408	1834	92	<<1
				363	1640	82	
3	SEPABEADS™ EC-HA	63	0,68	700	1900	95	14
				515	1392	70	
4	Lifetech™ ECR1504	55	0,56	115	256	13	72
5	Lifetech™ ECR1640	72	0,89	103	370	18	79
6	Lifetech™ ECR1604	62	0,66	109	286	14	70
7	DUOLITE™ A568	66	0,74	636	1908	95	15
				463	1392	70	

Ejemplo 5: Producción de epimerasas de trabajo

La psicosa-3-epimerasa se produjo en el laboratorio a una escala de 4-5 l. Se diseñó un proceso por lotes utilizando *E. coli* cepa ASR180. Este experimento también se realizó con ASR 182, pero con el fin de mostrar un ejemplo, en el presente documento se muestran los datos y resultados del ASR180. Se utilizó el medio M9 en el matraz: dextrosa 5,0 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 12,8 g/l; KH_2PO_4 5,0 g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; NaCl 0,5 g/l; MgSO_4 0,3 g/l; CaCl_2 0,03 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 50 mg/l; y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,8 mg/l. La tiamina se añadió asépticamente a una concentración de 0,05 g/l. Se utilizaron de 1,5 a 1,8 ml de inóculo de un vial congelado para inocular un matraz agitador de 50 ml. Los matraces se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 8 a 9 h o hasta alcanzar una DO660 de 3,5-5,0 unidades.

Cuando la DO660 alcanzó de 3,0 a 5,0 unidades en el matraz agitador, el cultivo se transfirió a un fermentador de siembra con una proporción del 1,0 %. Se utilizó el medio M9 en el fermentador de siembra: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 12,8 g/l; KH_2PO_4 5,0 g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; NaCl 0,5 g/l; MgSO_4 0,3 g/l; CaCl_2 0,03 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 50 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,8 mg/l; ácido cítrico de 0,0 a 1,5 g/l; y antiespumante 0,1 ml/l. La dextrosa y la tiamina se añadieron asépticamente a una concentración de 5,0 g/l y 0,05 g/l, respectivamente. Condiciones del tanque de siembra en EFT = 0: temperatura de 37 °C, pH de 7,0, agitador a 400 rpm y flujo de aire de 1,5 vvm. Durante la incubación, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 21 % en el punto de ajuste de 7,00, el oxígeno disuelto se controló al 35 % utilizando agitación (máx. 1000 rpm), y la concentración de dextrosa se mantuvo entre 2 y 10 g/l. El cultivo se incubó durante 12 a 14 h o hasta que la DO660 fue de 25 a 40 unidades.

Cuando la DO660 alcanzó de 25 a 40 unidades en el fermentador de siembra, el cultivo se transfirió a un fermentador de producción en una proporción del 2,5 %. Se usó el siguiente medio en el fermentador de producción: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,00 g/l; K_2HPO_4 8,00 g/l; NaCl 2,00 g/l; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1,00 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,00 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,03 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,05 g/l; ácido cítrico de 0,0 a 1,5 g/l; antiespumante 0,01 ml/l; y solución de micronutrientes Neidhardt 0,40 ml/l. La solución de micronutrientes Neidhardt consistía en: $(\text{NH}_4)_6(\text{MO}_7)_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ 0,18 g/l; H_3BO_3 1,24 g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,36 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,12 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ 0,80 g/l; y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,14 g/l. La dextrosa y la tiamina se añadieron asépticamente a una concentración de 5,0 g/l y 0,05 g/l, respectivamente. Condiciones del tanque de producción en EFT = 0: temperatura de 37 °C, pH de 7,0, agitador a 400 rpm y flujo de aire de 1,5 vvm. Durante la fase de crecimiento, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 28 % en el punto de ajuste de 7,00, el oxígeno disuelto se controló al 35 % utilizando agitación (máx. 1000 rpm), y la concentración de dextrosa se mantuvo entre 2 y 10 g/l. La fase de crecimiento duró hasta que la DO660 fue de 25 a 30 unidades.

Una vez que la DO 660 alcanzó de 25 a 30 unidades en el fermentador de producción, comenzó la fase de inducción. Se añadió un bolo de lactosa de 2,00 g/l a 10 g/l o IPTG 0,8 mmol/l y extracto de levadura de 0,6 a 1,80 g/l y la temperatura se redujo linealmente de 37 °C a 30 °C en el transcurso de 1 h. Condiciones del tanque de producción después de la inducción fueron: temperatura de 30 °C, pH de 7,0, agitador de 400 a 1000 rpm y flujo de aire de 1,5 vvm. Durante la fase de inducción, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 21 % en el punto de ajuste de 7,00 y la concentración de dextrosa se mantuvo por debajo de 1,0 g/l.

Ejemplo 6: Producción de epimerasa a escala piloto

Se desarrolló un protocolo de alimentación discontinua para aumentar la producción de psicosa-3-epimerasa. Se utilizó la cepa ASR180 de *E. coli*. Este experimento también se realizó con ASR182, pero con el fin de mostrar un ejemplo, en el presente documento se mostrarán los datos y resultados del ASR180. Se utilizó el medio M9 en el matraz: dextrosa 5,0 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 12,8 g/l; KH_2PO_4 5,0 g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; NaCl 0,5 g/l; MgSO_4 0,3 g/l; CaCl_2 0,03 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 50 mg/l; y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,8 mg/l. La tiamina se añadió asépticamente a una concentración de 0,05 g/l. Se utilizaron de 1,5 a 1,8 ml de inóculo de un vial congelado para inocular dos matraces de 2 l con 250 ml de medio. Los matraces se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 12 a 14 h o hasta alcanzar una DO660 de 3,5-5,0 unidades.

Cuando la DO660 alcanzó de 3,0 a 5,0 unidades en el matraz agitador, el cultivo se transfirió a un fermentador de siembra con una proporción del 1,0 %. Se utilizó el medio M9 en el fermentador de siembra: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 12,8 g/l; KH_2PO_4 5,0 g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; NaCl 0,5 g/l; MgSO_4 0,3 g/l; CaCl_2 0,03 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 50 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,8 mg/l; ácido cítrico de 0,0 a 1,5 g/l; y antiespumante 0,1 ml/l. La dextrosa y la tiamina se añadieron asépticamente a una concentración de 35 a 40 g/l y 0,05 g/l, respectivamente. Condiciones del tanque de siembra en EFT = 0: temperatura de 37 °C, pH de 7,0, agitación de 200 rpm, flujo de aire de 1,5 vvm y contrapresión de 2,05 bares (15 psig). Durante la incubación, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 28 % en el punto de ajuste de 7,00 y el oxígeno disuelto se controló al 35 % mediante agitación (máx. 500 rpm). El cultivo se incubó hasta que la DO660 fue de 25 a 30 unidades.

Cuando la DO660 alcanzó de 25 a 30 unidades en el fermentador de siembra, el cultivo se transfirió a un fermentador de producción en una proporción del 2,5 %. Se usó el siguiente medio en el fermentador de producción: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,00 g/l; K_2HPO_4 8,00 g/l; NaCl 2,00 g/l; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1,00 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,00 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,03 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,05 g/l; ácido cítrico de 0,0 a 1,5 g/l; antiespumante 0,01 ml/l; y solución de micronutrientes Neidhardt 0,40 ml/l. La solución de micronutrientes Neidhardt consistía en: $(\text{NH}_4)_6(\text{MO}_7)_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ 0,18 g/l; H_3BO_3 1,24 g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,36 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,12 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ 0,80 g/l; y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,14 g/l. La dextrosa y la tiamina se añadieron asépticamente a una concentración de 5,0 g/l y 0,05 g/l, respectivamente. Condiciones del tanque de producción en EFT = 0: temperatura de 37 °C, pH de 7,0, agitación de 100 rpm, flujo de aire de 1,5 vvm y contrapresión

de 2,05 bares (15 psig). Durante la fase de crecimiento, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 28 % en el punto de ajuste de 7,00, el oxígeno disuelto se controló al 35 % utilizando agitación (máximo 340 rpm), y la concentración de dextrosa se mantuvo entre 2 y 10 g/l. La fase de crecimiento duró hasta que la DO660 fue de 25 a 30 unidades.

Una vez que la DO 660 alcanzó de 25 a 30 unidades en el fermentador de producción, comenzó la fase de inducción. Se añadió un bolo de lactosa 5,00 g/l o IPTG 0,8 mmol/l y la temperatura se redujo linealmente de 37 °C a 30 °C en el transcurso de 1 h. Condiciones del tanque de producción tras la inducción: temperatura de 30 °C, pH de 7,0, agitación de 340 rpm, flujo de aire de 1,5 vvm y contrapresión de 2,05 bares (15 psig). Durante la fase de inducción, el pH se controló con NH_4OH acuoso al 28 % en el punto de ajuste de 7,00, el oxígeno disuelto fue "tal cual" y la concentración de dextrosa se mantuvo por debajo de 1,0 g/l. Los resultados de la actividad específica de la enzima a lo largo de la fermentación a escala piloto pueden verse en la figura 8. Además, la figura 18 muestra la producción de psicosa-3-epimerasa producida por ASR180 en el transcurso de esta fermentación.

Al final de la fermentación, el caldo de fermentación se procesó añadiendo sales de fosfato de sodio hasta una concentración final de fosfato 50 mM y pH de 7,5. El caldo de fermentación se pasó por un homogeneizador (Panda NS1001L 2K de Niro-Soavi, Inc.) a 800-1000 bares, 4 °C para desorganizar las células. El lisado bruto se aclaró por centrifugación, seguida de filtración con tierra de diatomeas para eliminar cualquier resto celular. El sobrenadante se utilizó para la inmovilización.

Para la inmovilización de la enzima se utilizó la resina de Dow DUOLITE™ A568. Antes de la inmovilización, la resina se regeneró según el protocolo del fabricante y se lavó con tampón fosfato 50 mM con MgSO_4 2 mM, pH 7,5. Se determinó que una carga de proteína de 100 mg/g de resina seca era óptima para obtener la máxima inmovilización enzimática. Se rellenó una columna de vidrio encamisada (vidrio Ace n.º 15 mm × 450 mm) con un volumen conocido de resina. Se hizo recircular un volumen conocido de lisado bruto a través del lecho de resina a 2-4 BV/h durante 4 h. A continuación, se lavó el lecho de resina con 10 volúmenes de lecho de tampón fosfato 50 mM con MgSO_4 2 mM, pH 7,5, para eliminar cualquier proteína no unida. La resina se lavó de nuevo con glicerol:tampón fosfato 50 mM 1:1(v/v) con MgSO_4 2 mM, pH 7,5 y se guardó para su uso futuro. Los resultados pueden observarse en la figura 18. Como se observa en los datos del gel, la unión de la enzima psicosa-3-epimerasa a DUOLITE™ A568 es muy específica. La banda de 32 kd para la psicosa-3-epimerasa no se observa en la fracción eluida (carril 3) ni en la fracción de lavado posterior. La actividad de la psicosa-3-epimerasa se observa en la resina y no se observa actividad en la fracción eluida ni en la fracción de lavado.

Ejemplo 7: Conversión de fructosa en alulosa utilizando psicosa-3-epimerasa procedente de *Burkholderia sp. RPE4* inmovilizada sobre resina DUOLITE™ A568 de Dow

La reacción se llevó a cabo utilizando una alimentación consistente en fructosa cristalina solubilizada (al 50 % p/p) o jarabe de maíz de alta fructosa 90 (DS al 50 %), concentración de magnesio Mg^{+2} de 24-50 ppm, intervalo de pH de 7,7-6,5. El caudal se ajustó a 1 volumen de lecho por hora y la temperatura de la columna se mantuvo a 50 °C. Los resultados pueden verse en la figura 20. En estas condiciones, se observó una producción de alulosa cercana al equilibrio durante 3000 h con una pérdida mínima de rendimiento, lo que resultó sorprendente para esta resina. Según lo descrito por Woodyer *et al.*, una enzima epimerasa que se inmovilizó sobre la resina DUOLITE™ A568 mostró una disminución en el porcentaje de conversión de fructosa en alulosa en el transcurso del ensayo de tan sólo 8 h cuando la reacción se mantuvo a 53 °C.

Ejemplo 8: Conversión de fructosa en alulosa utilizando tagatosa-3-epimerasa de *Burkholderia sp. RPE4* inmovilizado sobre la resina Lifetech™ ECR8415

La reacción se llevó a cabo utilizando una alimentación consistente en fructosa cristalina solubilizada (al 50 % p/p) o jarabe de maíz de alta fructosa 90 (DS al 50 %), concentración de Mg^{+2} de 24-50 ppm, intervalo de pH de 7,7-6,5. El caudal se ajustó a 3-4 volúmenes de lecho por hora y la temperatura de la columna se mantuvo a 50 °C. En estas condiciones, se observó una producción de alulosa cercana al equilibrio durante aproximadamente 3000 h con una pérdida mínima de rendimiento. Los resultados pueden verse en el gráfico de la figura 21.

Ejemplo 9: Ensayo enzimático para muestras de fermentación

Las muestras de fermentación se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Se centrifugaron las muestras de fermentación (1 ml) y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se lisó con Bugbuster® (EMD Millipore), se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático. Los ensayos enzimáticos de psicosa-3-epimerasa se realizaron a 50 °C durante 5 min en fructosa al 3 % (p/p) y lisado celular (dilución 1:10 v/v) de lisado bruto. Las reacciones se detuvieron ajustando el pH a 2 con HCl al 5 % (v/v). Las mezclas de reacción se analizaron por HPLC. Una unidad de actividad D-psicosa-3-epimerasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de psicosa por minuto a pH 7,5 y 50 °C. Estos resultados se observan en la figura 22.

Ejemplo 10: Ensayo enzimático para la enzima inmovilizada

Una solución de 10 g de fructosa al 50 % (p/p) que contenía una alimentación compuesta por fructosa cristalina (al 50 % p/p) o jarabe de maíz de alta fructosa 90 (DS al 50 %), concentración de magnesio (Mg^{+2}) de 24-50 ppm, intervalo de pH de 7,75. Se añadió 1 g de enzima inmovilizada a esta mezcla de reacción y se incubó en un agitador orbital a

50 °C durante 60 min. Se midió el contenido de humedad de la enzima inmovilizada y se contabilizó en la reacción enzimática. Las reacciones se terminaron ajustando el pH a 2 con HCl al 5 % (v/v). La mezcla de reacción se analizó por HPLC. Una unidad de actividad D-psicosa-3-epimerasa se definió como la cantidad de resina con enzima inmovilizada necesaria para producir 1 umol de psicosa por minuto a pH 7,75 y 50°C.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de alulosa que comprende:
poner en contacto una solución que contiene fructosa con una enzima psicosa-3-epimerasa de una especie de *Burkholderia* que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12 durante un
5 tiempo y en unas condiciones adecuadas para convertir al menos una parte de la fructosa en alulosa.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha psicosa-3-epimerasa está inmovilizada sobre una resina de matriz sólida.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha resina de matriz sólida es una resina de intercambio aniónico de base débil.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha resina de matriz sólida es una resina condensada a base de fenol formaldehído funcionalizada para contener grupos de base libre de amina terciaria.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha matriz sólida es una resina a base de ácido metacrílico funcionalizada para contener enlaces amina C2-C6.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la conversión de fructosa en alulosa se realiza a una temperatura de entre 50 °C y 70 °C.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha solución de fructosa se selecciona entre fructosa cristalina solubilizada y jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF).
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha solución de fructosa tiene un contenido de sólidos disueltos de aproximadamente el 50 % p/p, el contacto se realiza a un intervalo de pH de 6,5-7,7 en presencia de magnesio con
20 una concentración de 24-50 ppm, y se realiza con un caudal de 1-4 volúmenes de solución de fructosa por volumen de lecho de la resina de matriz sólida.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha enzima psicosa-3-epimerasa se obtiene de un microorganismo que contiene un vector de ácido nucleico recombinante configurado operablemente para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ
25 ID NO:1 y SEQ ID NO:12.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho microorganismo es *E. coli* o *B. subtilis*.
11. Una secuencia de ácido nucleico recombinante configurada operativamente para expresar un ácido nucleico que codifica una enzima psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:12.
12. Un microorganismo transformado con una secuencia de ácido nucleico recombinante configurada operativamente para expresar un ácido nucleico que codifica una enzima psicosa-3-epimerasa que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12.
30
13. El microorganismo de la reivindicación 12, en el que el microorganismo se selecciona de *E. coli* y *B. subtilis*.
14. Una resina de matriz sólida que contiene una enzima psicosa-3-epimerasa con una secuencia polipeptídica seleccionada entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:12.
- 35 15. Una columna que contiene la resina de matriz sólida según la reivindicación 14 y que está configurada para recibir un flujo de entrada de una solución para que fluya sobre la resina de matriz sólida y para permitir la salida de un flujo de salida de la solución.

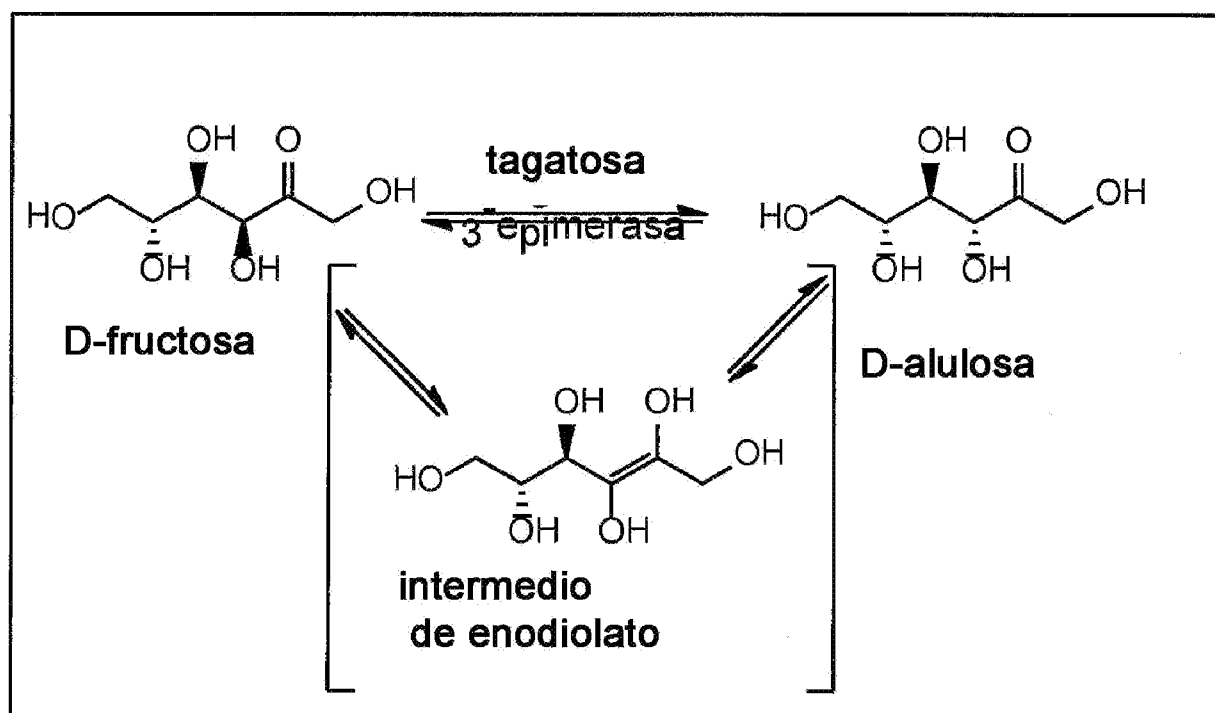
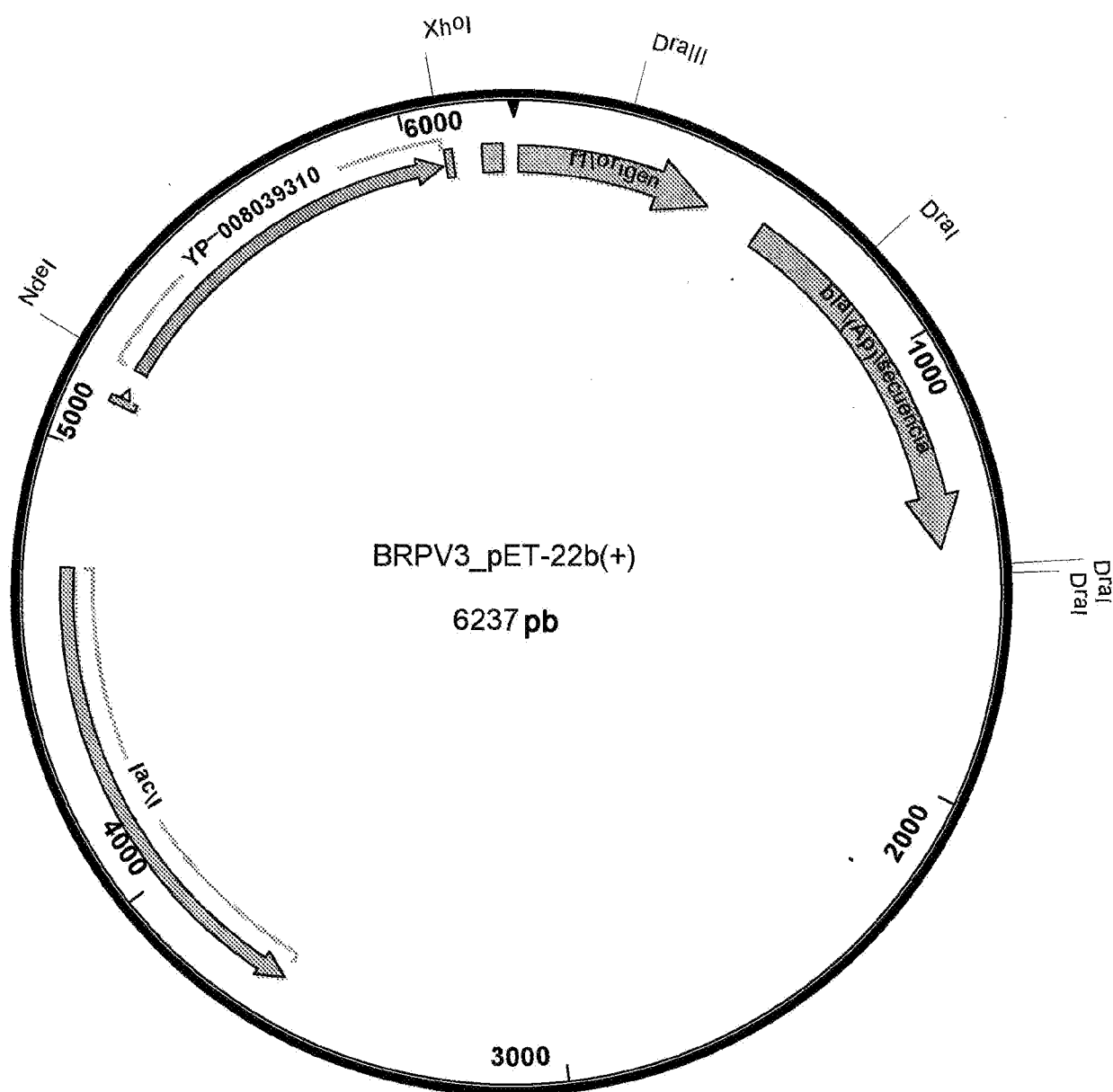


Figura 1: Bioconversión de D-fructosa en D-alulosa

Figura 2: Mapa de vectores de BRPV3_pET-22b(+)



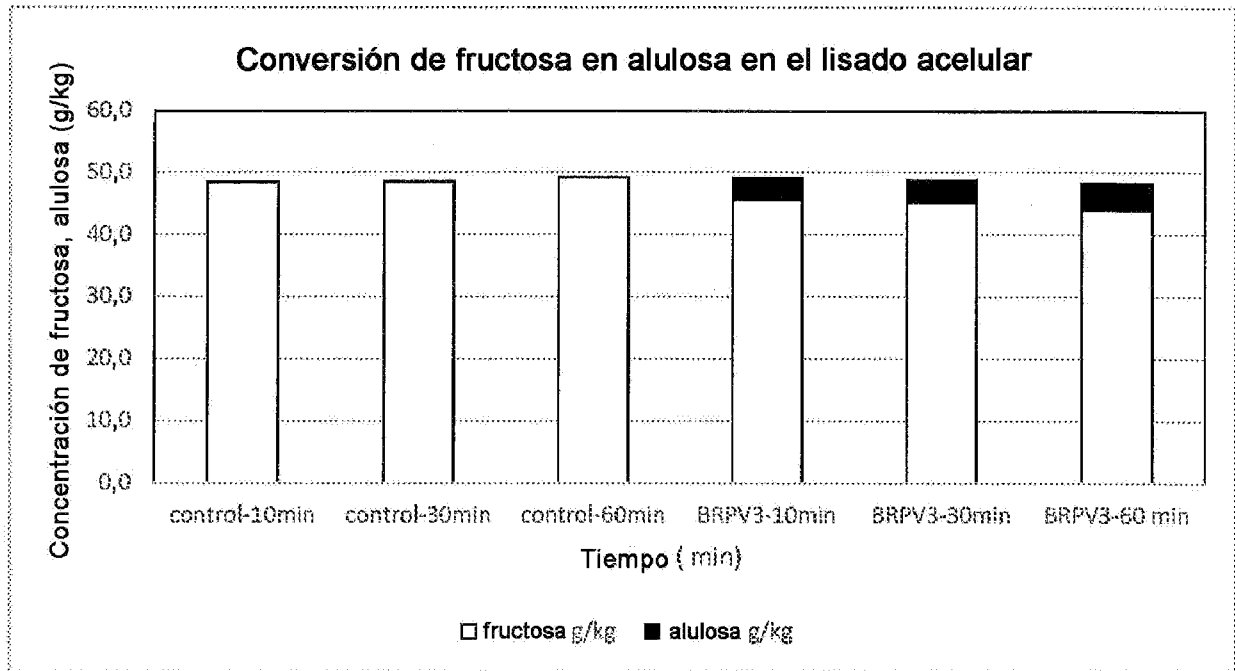


Figura 3: Evaluación de la actividad de la enzima psicosa-3-epimerasa en un lisado acelular

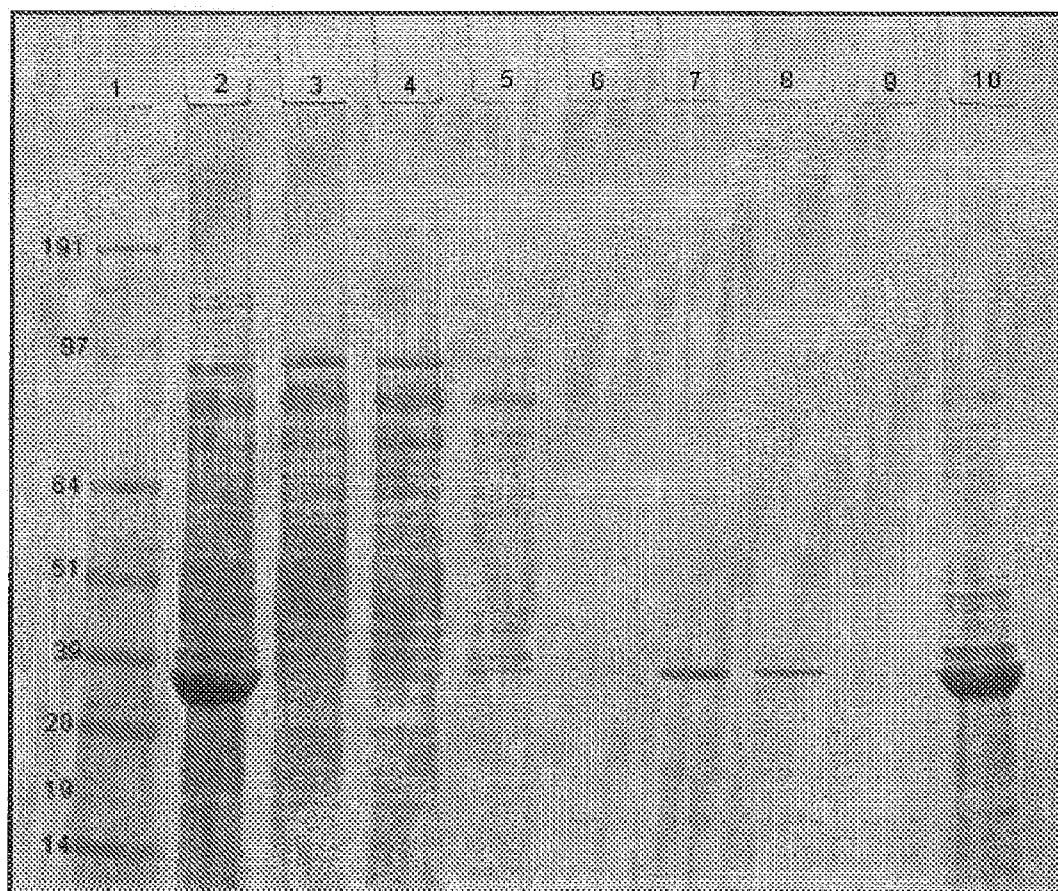


Figura 4: Gel de SDS PAGE que analiza las diferentes fracciones después de la purificación a pequeña escala. Carril 1: marcadores de peso molecular teñidos previamente; carril 2: lisado celular; carril 3: lisado celular eluido de la columna de níquel; carril 4: carga FT; carril 5: lavado; carril 6: fracción 1; carril 7: fracción 2; carril 8: fracción 3; carril 9: fracción 4; y carril 10: restos celulares. Se muestran los resultados del ejemplo 2.

5

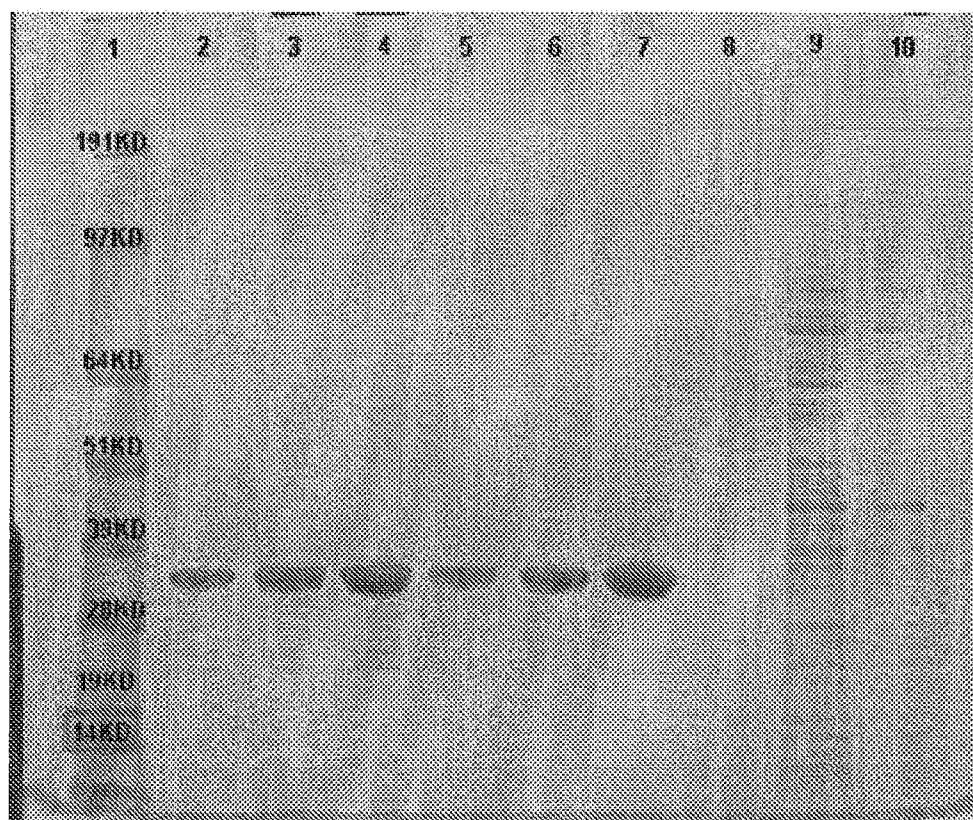


Figura 5: Expresión y purificación a gran escala de la psicosa-3-epimerasa que se muestra en un gel de SDS PAGE que analiza diferentes fracciones después de la purificación. Carril 1: patrón teñido previamente Blue Plus 2; carril 2: 1 ug de muestra dializada final (8,04 mg/ml, diluida 1:40); carril 3: 2 ug de muestra dializada final (8,04 mg/ml, diluida 1:40); carril 4: 4 ug de muestra dializada final (8,04 mg/ml, diluida 1:40); carril 5: 1 ug de agrupamiento de Ni (8,09 mg/ml, diluida 1:40); carril 9: corriente de carga de la columna de Ni (1:10); carril 10: corriente de lavado de la columna de Ni (1:10).

5

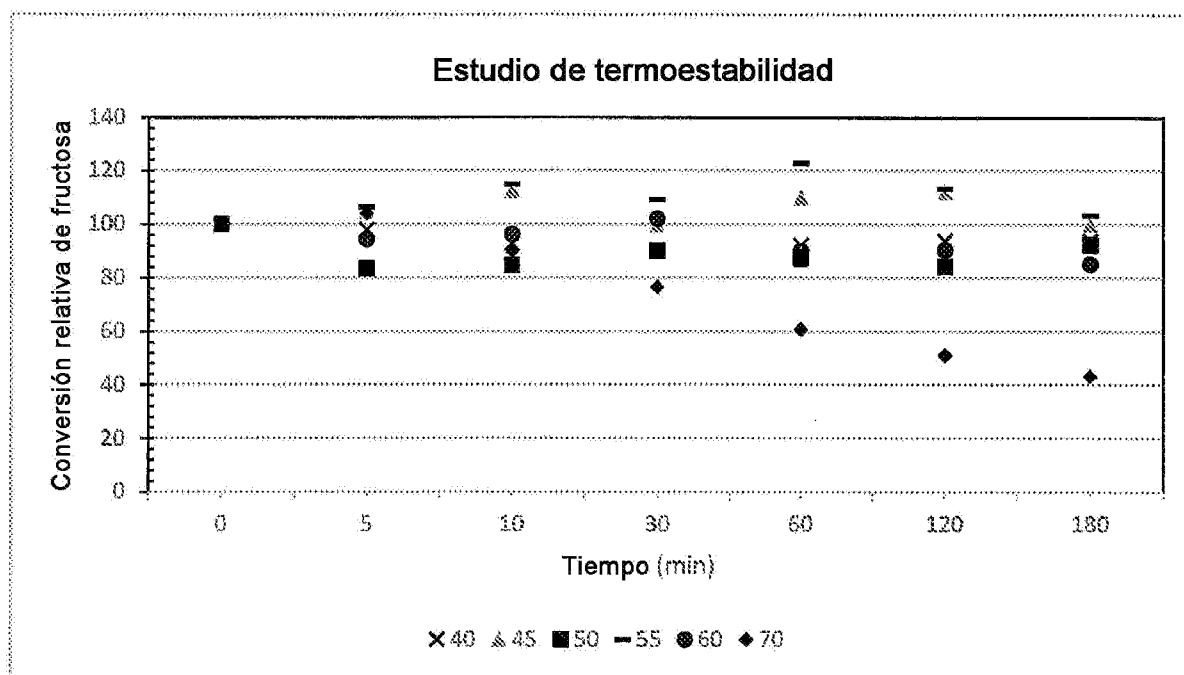
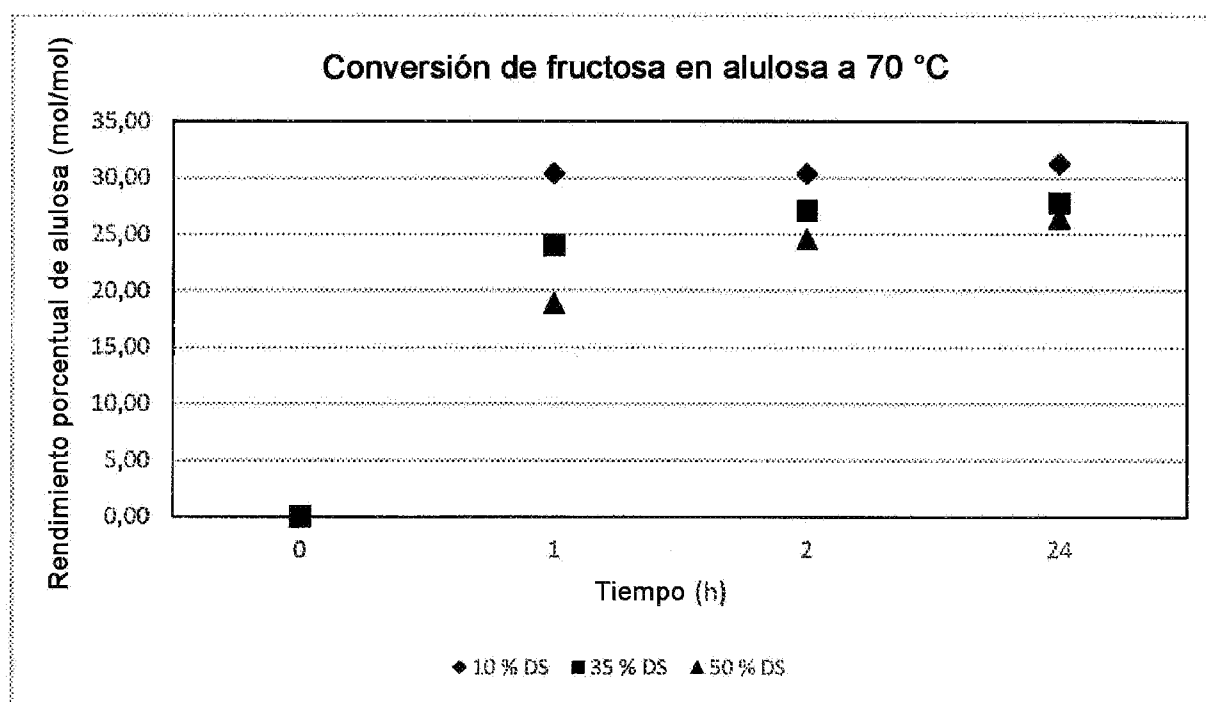


Figura 6: Evaluación de la termoestabilidad de la enzima psicosa-3-epimerasa.



5 Figura 7: Bioconversión de fructosa en alulosa catalizada por la enzima psicosa-3-epimerasa a 70 °C.

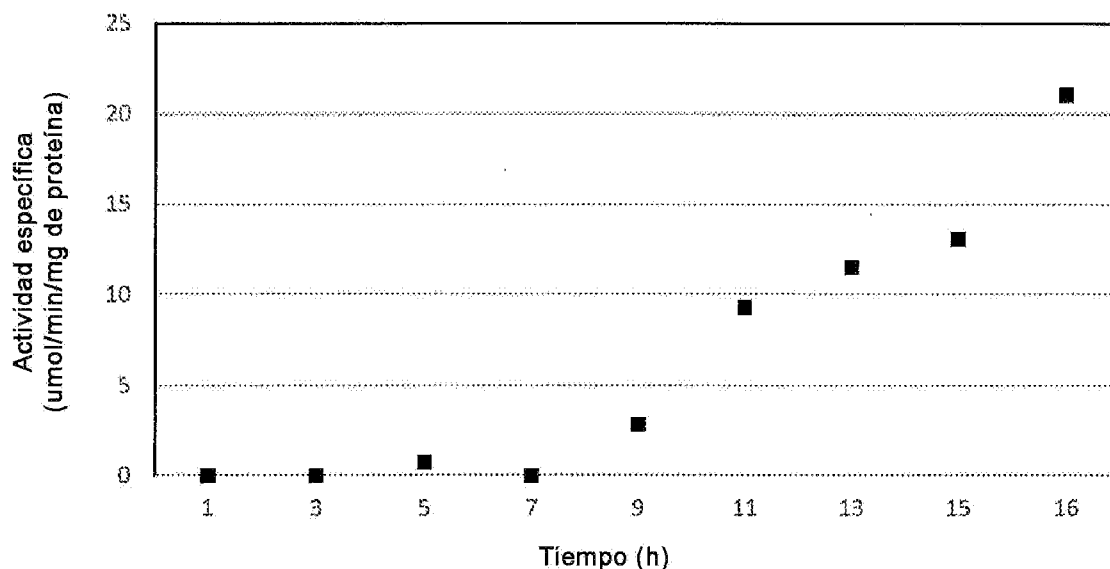


Figura 8: Actividad específica enzimática durante la fermentación a escala piloto según el ejemplo 6.

Figura 9:

5 La secuencia de proteína del gen de la psicosa-3-epimerasa procedente de *Burkholderia* RPE64

SEQ ID NO:1

MNKVGMFYTYWSTEWLVDFPAVAKRISGLGFDMMEISLSEFHNLPDAKKRELKTV
 ADDLGLTVMCCIGLKPEYDFASPEQSVRDAGTEYVKHLLDDCHMLGAPVFAGLTFC
 AWPQSPPPGMKDKRPYVERAVDSVRRVIKVAEGYGIIYALEVVNRFEQWLANDARE
 ALAFCDVADNPWCKVQLDTFHMNIEENSFRDAILACRGRLGHFHLGEANRLPPGEG
 RLPWDEIFGALKEIDYDGTIVMEPFMRPGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEQMDERA
 RRS LN FVRGHLA

Figura 10:

Secuencia de nucleótidos que codifica el gen de la psicosa-3-epimerasa procedente de *Burkholderia* RPE64

10 SEQ ID NO:2

ATGAACAAAGTAGGCATGTTCTATACATACTGGTCGACTGAATGGCTCGTGGATT
TTCCGGCTGTGGCGAAGCGCATCTCGGGTCTGGGTTTCGACATGATGGAGATCTC
GCTCTCCGAGTTCCATAACTTGCCTGATGCGAAGAAGCGCGAACTCAAGACCGTC
GCCGACGATCTCGGTTTGACGGTGATGTGCTGCATCGGTCTCAAGCCTGAGTACG
ATTTTCGCATCGCCGGAACAGAGCGTGCGCGATGCGGGCACGGAATACGTGAAGC
ATCTGCTCGACGATTGCCACATGCTCGGCGCACCGGTTTTTCGCGGGCCTGACATT
CTGCGCGTGGCCGCAATCGCCGCCGCCAGGCATGAAGGACAAGCGTCCATACGT
CGAACGCGCGGTGGACAGCGTGCGCCGTGTCATCAAGGTCGCTGAAGGTTACGG
CATTATCTACGCGCTGGAAGTGGTGAATCGCTTCGAGCAATGGCTCGCCAACGAT
GCACGCGAGGCGCTCGCGTTCTGCGATGCAGTCGATAATCCGTGGTGCAAGGTG
CAGCTCGATACGTTCCACATGAACATCGAAGAGAACTCGTTTCGCGATGCCATTC
TCGCGTGCCGCGGCCGTCTCGGACACTTCCATCTCGGCGAAGCGAACCCTTGCC
GCCGGGCGAAGGCCGTCTGCCGTGGGATGAAATCTTCGGCGCGTTGAAAGAGAT
CGACTACGACGGCACCATCGTCATGGAGCCGTTTCATGCGTCCTGGCGGCTCGGTG
AGTCGTGCCGTGGGCGTCTGGCGCGACATGTCGAACGGCGCGACGGATGAACAG
ATGGACGAACGCGCACGCCGTTTCATTGAACTTCGTGCGCGGTCATCTCGCG

Figura 11:

Secuencia del cebador 5' utilizado para amplificar SEQ ID NO:10 y para añadir el sitio de restricción NdeI con fines de clonación

5 SEQ ID NO:3

Ggaattgtgagcggataacaattcc

Figura 12:

Secuencia del cebador 3' utilizado para amplificar SEQ ID NO:10 y para añadir el sitio de restricción XhoI con fines de clonación y un codón de terminación

10 SEQ ID NO:4

attgctcgagTTAcgcgagatgaccgcgacgaagttc

Figura 13:

Secuencia del cebador utilizado para amplificar el gen thrC con homología con pET22b en el sitio de restricción DraIII con fines de clonación para crear BL21(DE3)thrC-

15 SEQ ID NO:5

gaatccCACGTAGTGcggctggatacggcgggcgcacg

Figura 14:

Secuencia del cebador utilizado para amplificar el gen thrC con homología con pET22b en el sitio de restricción DraI con fines de clonación para crear BL21(DE3)thrC-

20 SEQ ID NO:6

gctaaTTTAAAttactgatgattcatcatcaatttacg

Figura 15:

Secuencia de nucleótidos del casete que se amplificó para integrarse en el cromosoma y crear ASR182

SEQ ID NO:7

CGCGGCAGGCGGTTCGCGGAAATCGGCGCGGTAGCGAGCGGTATCTCCGGCTCCG
GCCCCGACCTTGTTGCTCTGTGTGACAAGCCGGAACCGCCCAGCGCGTTGCCGA
CTGGTTGGGTAAGAACTACCTGCAAAATCAGGAAGGTTTTGTTTCATATTTGCCGG
CTGGATACGGCGGGCGCACGAGTACTGGAAAATAAATGAAACTCTACAATCTG
AAAGATCACAACGAGCAGGTCAGCTTTGCGCAAGCCGTAACCCAGGGGTTGGGC
AAAAATCAGGGGCTGTTTTTTCCGCACGACCTGCCGGAATTCAGCCTGACTGAAA
TTGATGAGATGCTGAAGCTGGATTTTGTACCCCGCAGTGCGAAGATCCTCTCGGC
GTTTATTGGTGATGAAATCCACAGGAAATCCTGGAAGAGCGCGTGCGCGCGGC
GTTTGCCTTCCCGGCTCCGGTCGCCAATGTTGAAAGCGATGTCGGTTGTCTGGAA
TTGTTCCACGGGCCAACGCTGGCATTTAAAGATTTCCGGCGGTGCTTTATGGCAC
AAATGCTGACCCATATTGCGGGTGATAAGCCAGTGACCATTCTGACCGCGACCTC
CGGTGATACCGGAGCGGCAGTGGCTCATGCTTTCTACGGTTTACCGAATGTGAAA
GTGGTTATCCTCTATCCACGAGGCAAAATCAGTCCACTGCAAGAAAAACTGTTCT
GTACATTGGGCGGCAATATCGAAACTGTTGCCATCGACGGCGATTTCGATGCCTG
TCAGGCGCTGGTGAAGCAGGCGTTTGATGATGAAGAACTGAAAGTGGCGCTAGG
GTTAAACTCGGCTAACTCGATTAACATCAGCCGTTTGCTGGCGCAGATTTGCTAC
TACTTTGAAGCTGTTGCGCAGCTGCCGCAGGAGACGCGCAACCAGCTGGTTGTCT
CGGTGCCAAGCGGAAACTTCGGCGATTTGACGGCGGGTCTGCTGGCGAAGTCAC
TCGGTCTGCCGGTGAAACGTTTTATTGCTGCGACCAACGTGAACGATACCGTGCC
ACGTTTCCTGCACGACGGTCAGTGGTCACCCAAAGCGACTCAGGCGACGTTATCC
AACGCGATGGACGTGAGTCAGCCGAACAACCTGGCCGCGTGTGGAAGAGTTGTTC
CGCCGCAAAATCTGGCAACTGAAAGAGCTGGGTATATGCAGCCGTGGATGATGAA
ACCACGCAACAGACAATGCGTGAGTTAAAGAAGCTGGGCTACACTTCGGAGCCG
CACGCTGCCGTAGCTTATCGTGCGTgctgctgatcagttgaatccaggcgaatatGGCTTGTTCTCG
GCACCGCGCATCCGGCGAAATTTAAAGAGAGCGTGGAAGCGATTCTCGGTGAAA
CGTTGGATCTGCCAAAAGAGCTGGCAGAACGTGCTGATTTACCCTTGCTTTCACA
TAATCTGCCCCGCCGATTTTGCTGCGTTGCGTAAATTGATGATGAATCATCAGTAA
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTA
GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAAGTAGGCAT
GTTCTATACATACTGGTCGACTGAATGGCTCGTGGATTTTCCGGCTGTGGCGAAG
CGCATCTCGGGTCTGGGTTTCGACATGATGGAGATCTCGCTCTCCGAGTTCCATA
ACTTGCCTGATGCGAAGAAGCGCGAACTCAAGACCGTCGCCGACGATCTCGGTTT
GACGGTGATGTGCTGCATCGGTCTCAAGCCTGAGTACGATTTTCGCATCGCCGGA
CAGAGCGTGCGCGATGCGGGCACGGAATACGTGAAGCATCTGCTCGACGATTGC
CACATGCTCGGCGCACCGGTTTTTCGCGGGCCTGACATTCTGCGCGTGGCCGCAAT
CGCCGCCGCCAGGCATGAAGGACAAGCGTCCATACGTGCAACGCGCGGTGGACA
GCGTGCGCCGTGTCATCAAGGTCGCTGAAGGTTACGGCATTATCTACGCGCTGGA
AGTGGTGAATCGCTTCGAGCAATGGCTCGCCAACGATGCACGCGAGGCGCTCGC
GTTCTGCGATGCAGTCGATAATCCGTGGTGCAAGGTGCAGCTCGATACGTTCCAC

ATGAACATCGAAGAGAACTCGTTTCGCGATGCCATTCTCGCGTGCCGCGGGCCGTC
TCGGACACTTCCATCTCGGCGAAGCGAACCCTTGCCGCCGGGCGAAGGCCGTC
TGCCGTGGGATGAAATCTTCGGCGCGTTGAAAGAGATCGACTACGACGGCACCA
TCGTCATGGAGCCGTTTCATGCGTCCTGGCGGCTCGGTGAGTCGTGCCGTGGGCGT
CTGGCGCGACATGTCGAACGGCGCGACGGATGAACAGATGGACGAACGCGCAC
GCCGTTTCATTGAACTTCGTGCGCGGTCATCTCGCGTAAAATCTATTTCATTATCTCA
ATCAGGCCCGGGTTTGCTTTTATGCAGCCCGGCTTTTTTATGAAGAAATTATGGAG
AAAAATGACAGGGAAAAAGGAGAAATTCTCAATAAATGCGGTAACTTAGAGATT
AGGATTGCGGAGAATAACAACCGCCGTTCTCATCGAGTAATCTCCGGATATCGAC
CCATAACGGGCAATGATA

Figura 16:

Secuencia de nucleótidos del cebador 5' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:7

SEQ ID NO:8

5 CGCGGCAGGCGGTCGCGGAAATCGGC

Figura 17:

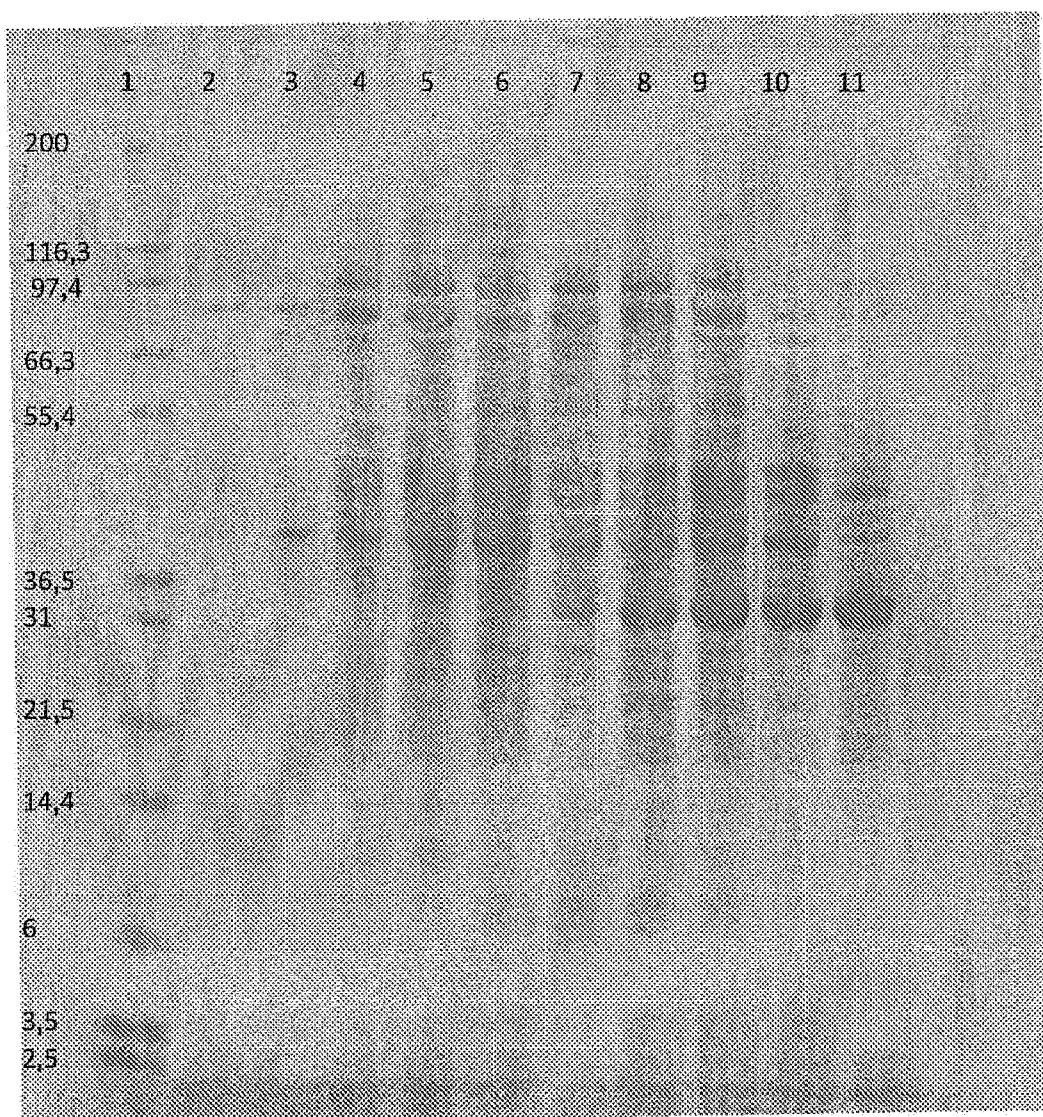
Secuencia del cebador 3' utilizado para amplificar la SEQ ID NO:7

SEQ ID NO:9

TATCATTGCCCGTTATGGGTCGATATC

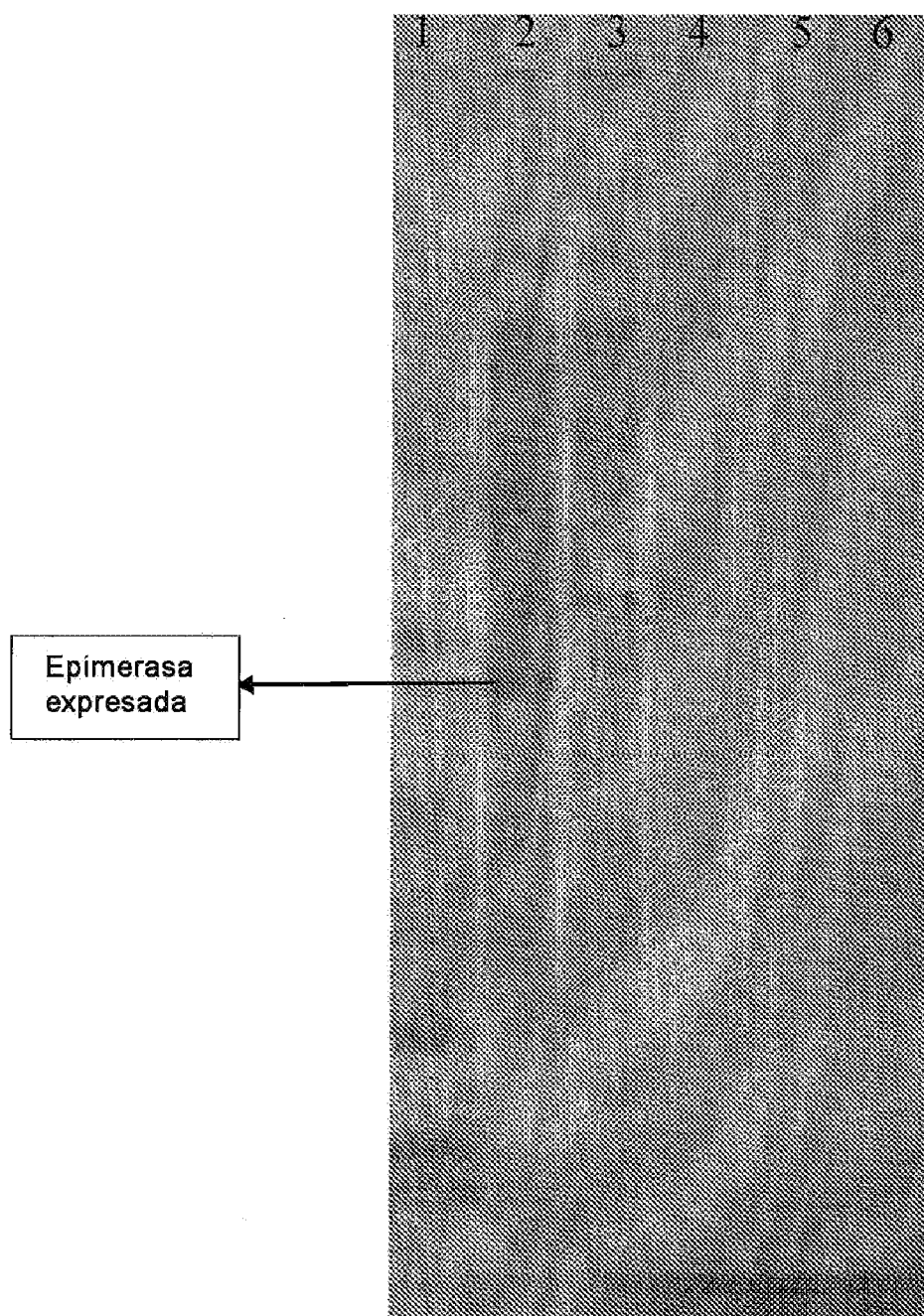
10

Figura 18: Producción de psicosa-3-epimerasa por ASR180 durante la fermentación, tal como se describe en el ejemplo 6.



1-Marcadores de peso molecular; 2-ASR180 CT2; 3- ASR180 CT4; 4-ASR180 CT6; 5-ASR180 CT7; 6-ASR180 CT8; 7-ASR180 CT10; 8-ASR180 CT12; 9-ASR180 CT14; 10-ASR180CT final 11- BL21(DE3)/p-3-13

Figura 19: Inmovilización del lisado bruto procedente de la fermentación a escala piloto de ASR180 sobre la resina DUOLITE™ A568.



Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: lisado bruto de ASR180; carril 3: filtrado después de la inmovilización; carril 4: lavado de la enzima inmovilizada 1; carril 5: lavado de la enzima inmovilizada 2; carril 6: lavado de la enzima inmovilizada 3.

Figura 20: Conversión de fructosa en alulosa usando la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* sp. REP4 inmovilizada sobre la resina DUOLITE™ A568, tal como se describe en el ejemplo 7.

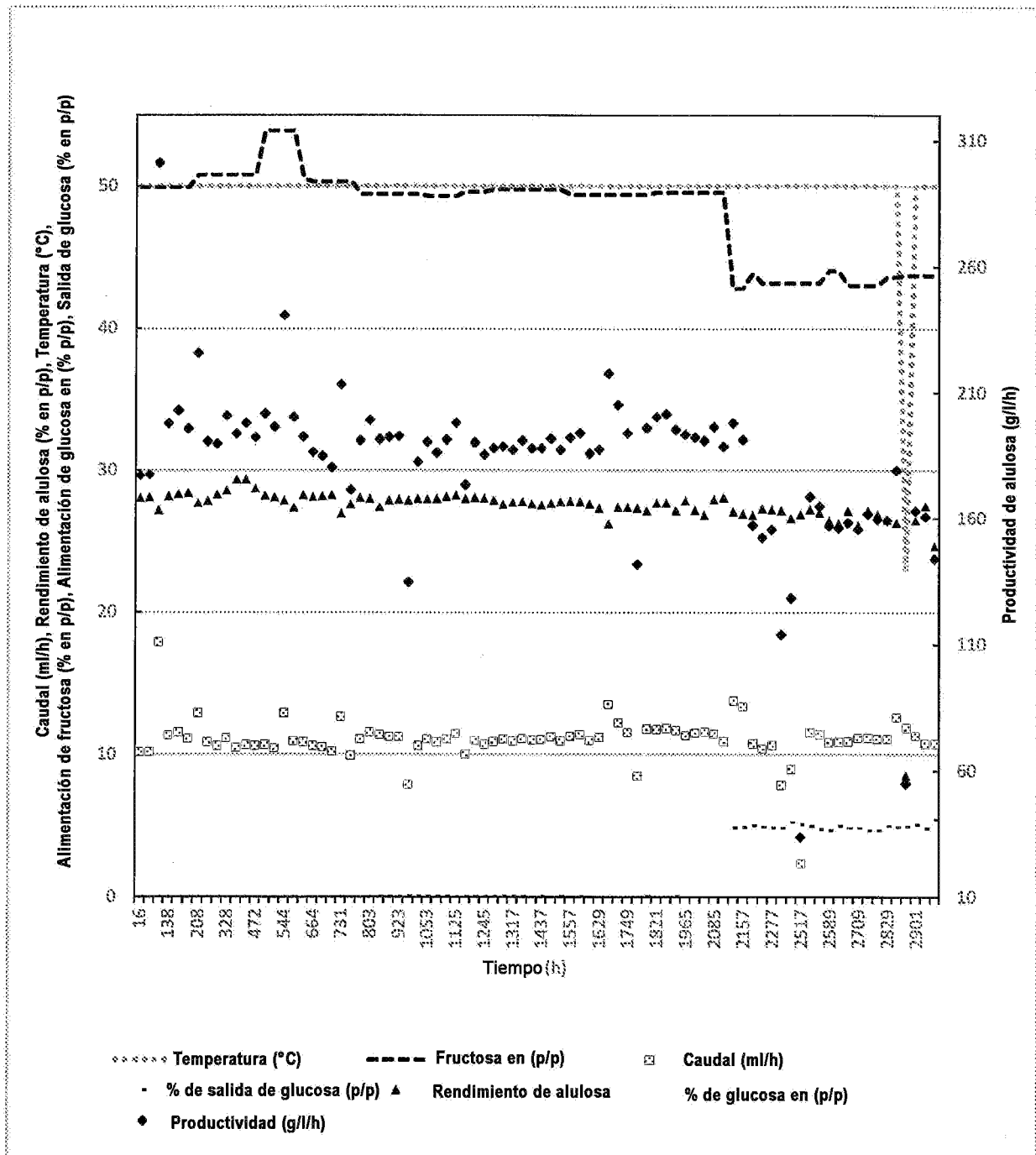


Figura 21: Conversión de fructosa en alulosa utilizando la psicosa-3-epimerasa de *Burkholderia* sp. REP4 inmovilizada sobre la resina Lifetech™ ECR8415, tal como se observa en el ejemplo 8.

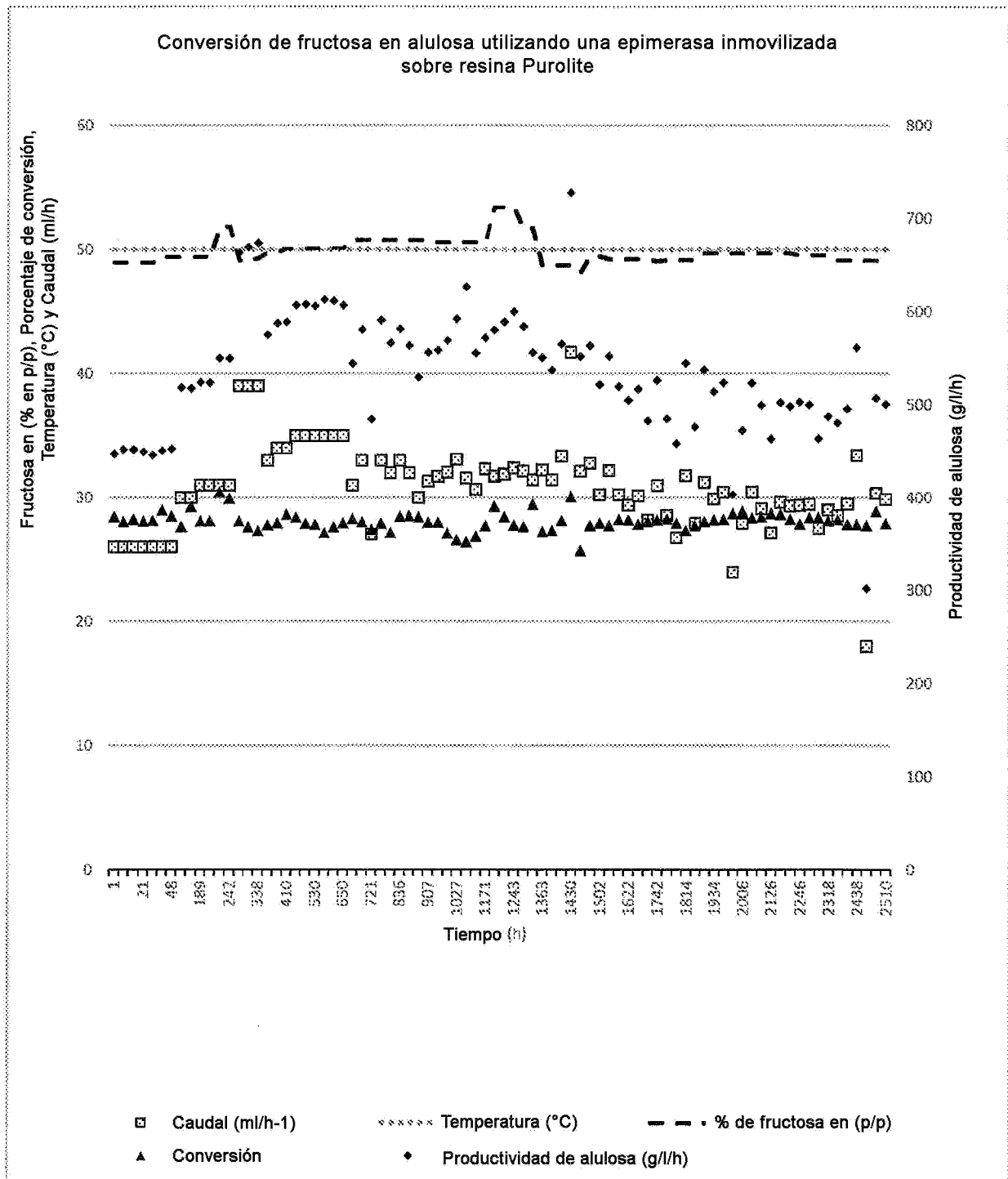


Figura 22: Resultados del ensayo enzimático, tal como se describe en el ejemplo 9.

Muestra	Actividad
Alimentación	2,2 U/mg
Enzima inmovilizada	21 U/g _{IE}
Filtrado	0
Lavado	0

Figura 23:

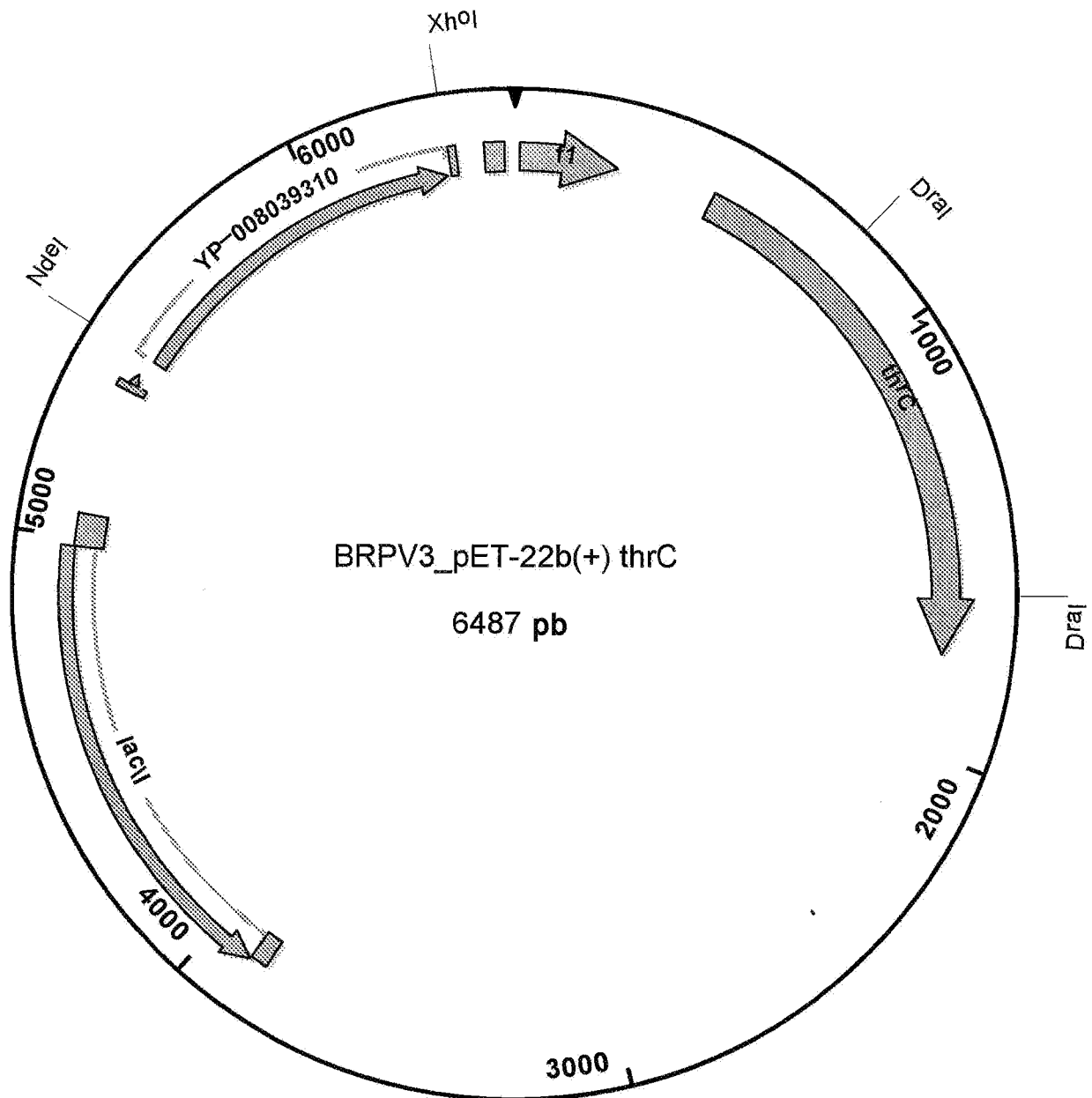


Figura 24: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 con un sitio de restricción NdeI y XhoI. Los sitios de restricción están resaltados en gris.

SEQ ID NO:10

CAIATGaacaaagtaggcatgttctatacatactggctgactgaatggctcgtggattttccggctgtggcgaagcgcatctcggg
actgggtttcgacatgatggagatatcgctctccgagttccataacttggccgatgcgaagaagcgcgaaactaaagaccgtcgccgac
gatctcgggtttgacgggtgatgtgctgcatcggtctcaagcccagtagcatttcgcatcgccggaacagagcgtgcgcgatcggggca
cggaatacgtgaagcatctgctcgacgattgccatagctcggcgccacgggtttcggggcctgacattctgcgcgtggccgcaatc
ggcgccgccccggcatgaaggacaagcgctccatacgtcgaacgcgcgggtggacagcgtgcgccgtgtcatcaaggctcgctgaagg
gtacggcattatctacgcgctggaagtgggtgaatcgcttcgagcaatggctcgccaacgatgcacgcgaggcgctcgcttctcgat
gcagtcgataatccgtggtgcaagggtgcagctcgatacgttccacatgaacatcgaagagaactcgtttcgcatgccattctcgctg
ccgcggcaggctcgacacttccatctcggcgaaagcgaaccgcttccgcccggcggaaggccgtctccgtgggatgaaatcttcg
gcgcgttgaaagagatcgactacgacggcaccatcgctcatggagccgttcatgcgtccggcgggctcgggtgagtcgtgccgtgggc
gtctggcgcgacatgtcgaacggcgcgacggatgaacagatggacgaacgcgcacgccgctcattgaattcgtgcgcggacatct
cgcgCTCGAG

- 5 **Figura 25:** Secuencia de proteína de *Pseudomonas cichorii* (4XSL_A) que se usó en la búsqueda BLAST que condujo al descubrimiento de SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:11

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLGEFHNLSDAKKRELKAV
ADDLGLTVMCSIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFC
AWPQSPPLDMKDKRPYVDRAIESVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
AIAFADAVDSPACKVQLDTFHMNIEETSFRDAILACKGKMGHFHLGEANRLPPGEGR
LPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVG VWRDMSNGATDEEMDERAR
RSLQFVRDKLAGSRSHHHHHH

Figura 26: SEQ ID NO:12 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWLVDFPAVAKRISELGFDMMMEISLSEFHTLPDAKKRELKAVA
DDLGLTVMCCIGLKQEYDFASPEQSVRDAGTEYVKRLDDCHMLGAPVFAGLTFCA
WPQSPPPGMKDKRPYVERAIDS VRRVIKVAEGYVIYALEIVNRFEQWLANDAREAL
AFCDVDNPWCRVQLDTFHMNIEENSFRDAILACKWRLGHFHLGEANRLPPGEGRL
PWDEIFGALKEIDYDGTIVMEPFMRPGGSVSRAVG VWHDMNSNGATDEQMDERARR
SLQFVRGRLS

10

Figura 27: SEQ ID NO:13 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDMMMEISLGEFHNLPDAKKRELKAI
ADDLGLTVMCCIGLKPEYDFASPEQSVRDAGTEYVKRLDDCHMLGAPVFAGLTFC
AWPQSPPPGMKDKRPYVDHAIDS VRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
ALAFVDAVDSPACKVQLDTFHMNIEEHSFRDAILACKGKLGHFHLGEANRLPPGEGR
LPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVG VWRDMSNGATDEQMDERAR
RSLQFVRGKLT

Figura 28: SEQ ID NO:14 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDMMESLGEFHNLSDAKKRELKTV
 ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPEQSVRDAGTEYVKRLDDCHMLGAPVFAGLTFC
 AWPQSPPLDMKDKRPYVDRAIDSVRRVVKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
 ALAFADAVIDSPACKVQLDTFHMNIEESSFRDAILACKGKLGHFHLGEANRLPPGEGR
 LPWDEIFGALKEIDYDGTIVMEPFMRKGGAVSRAVGVWRDMSNGATDEQMDERAR
 RSLQFVRGKLA

Figura 29: SEQ ID NO:15 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATARRIAGLGFDMMESLGEFHNLPDAKKRELKTV
 ADDLGLTVMCCIGLKPEYDFASPEQSVRDAGTEYVKRLDDCHMLNAPVFAGLTFC
 AWPQSPPLDMKDKRPYVDRAIDSVRRVIDVAEGYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
 AIAFADAVGSPACKVQLDTFHMNIEESSFRDAILACKGKLGHFHLGEANRLPPGEGR
 LPWDEIFGALKEIDYDGTIVMEPFMRKGGPVSRVGVWRDMSNGATDEQMDERAR
 RSLQFVRGKLSS

Figura 30: SEQ ID NO:16 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDMMESLGEFHNLPDAKKRELKSV
 ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFC
 AWPQSPPLDMKDKRPYVDRAIDSVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
 ALAFADAVIDSPACKVQLDTFHMNIEESSFRDAILACKGKMGHFHLGEANRLPPGEG
 RLPWDEIFGALKEIEYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEQMDERA
 RSLQFVREKLA

5

Figura 31: SEQ ID NO:17 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDMMESLGEFHNLPDAKKRELKAIADDLGL
 TVMCCIGLKPEYDFASPEQSVRDAGTEYVKRLDDCHMLGAPVFAGLTFC AWPQSP
 PPGMKDKRPYVDHAIDSVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKEALAFVD
 AVDSPACKVQLDTFHMNIEEHSFRDAILACKGKLGHFHLGEANRLPPGEGRLPWDEI
 FGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEQMDERARRSLQFV
 RGKLT

Figura 32: SEQ ID NO:18 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEWVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLGEFHNLPDAKKRELKAV
 ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFC
 AWPQSPPLDMRDKRPYVDRAIEGVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKE
 AIAFADAVIDSPACKVQLDTFHMNIEETSFRDAILACKGKMGHFHLGEANRLPPGEGR
 LPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEEMDERAR
 RSLQFVRDKLA

10

Figura 33: SEQ ID NO:19 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEW MVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLGEFHNLSDAKKRELKAV
ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFC
AWPQHPPLDMVDKRPYVDRAIESVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRYEQWLCNDAKE
AIAFADAVDSPACKVQLDTFHMNIEENSFRDAILACKGKMGHFHLGEQNLPPGEGR
LPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRTGGSVSRAVCVWRDLSNGATDEEMDERARR
SLQFVRDKLALEHHHHHH

Figura 34: SEQ ID NO:20 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MFYTYWSTEW MVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLGEFHNLPDAKKRELKAVADDLGL
TVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFCAWPQSP
PLDMRDKRPYVDRAIEGVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKEAIAFAD
AVDSPACKVQLDTFHMNIEETSFRDAILACKGKMGHFHLGEANRLPPGEGRLPWDEI
FGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEEMDERARRSLQFV
RDKLA

Figura 35: SEQ ID NO:21 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYSYWSTEW MVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLSEFHNLSDAKKRELKAV
ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLNFC
AWPQHPPLDMVDKRPYVDRAIESVRRVIKVAEDYGIIYALEAVNRYEQWLCNDAKE
AIAFADAVDSPACKVHLDTFHMNIEENSFRDAILACKGKMGHFHLGEQNLPPGEGR
LPWDEIFGALKEIGYDGTIVIEPFMRTGGSVSRAVCVWRDLSNGATDEEMDERARRS
LQFVRDKLALEHHHHHH

5

Figura 36: SEQ ID NO:22 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MNKVGMFYTYWSTEW MVDFPATAKRIAGLGFDLMEINLEEFHNLSDAKKRELKAV
ADDLGLTVMCCIGLKSEYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLNFC
AWPQHPPLDMVDKRPYVDRAIESVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRYEQWLCNDAKE
AIAFADAVDSPACKVQLDTFHMNIEENSFRDAILACKGKMGVVFHIGEQLPPGEGR
LPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRTGGSVGRDVCVWRDLSNGATDEEMDERARR
SLQFVRDKLALEHHHHHH

Figura 37: SEQ ID NO:23 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MVDFPATAKRIAGLGFDLMEISLGEFHNLPDAKKRELKSVADDLGLTVMCCIGLKS
EYDFASPDKSVRDAGTEYVKRLDDCHLLGAPVFAGLTFCAWPQSPPLDMKDKRPY
VDRAIDSVRRVIKVAEDYGIIYALEVVNRFEQWLCNDAKEALAFADAVDSPACKVQ
LDTFHMNIEESSFRDAILACKGKMGHFHLGEANRLPPGEGRLPWDEIFGALKEIEYDG
TIVMEPFMRKGGSVSRAVGVWRDMSNGATDEQMDERARRSLQFVREKLA

Figura 38: SEQ ID NO:24 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MMEISLSEFHTLPETKKRELKTVADDLGLTVMCCIGLKQEYDFASPEQSVRDAGTEY
VKRLDDCHMLGAPVFAGRTFCAWPQSPPPGMTDKRPYVDRAIDSVRRMIKVAEG
HGIIYALEVVNRFQQLANDAREALAFCDVDNPWCRVQFVRGHLA

Figura 39: SEQ ID NO:25 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MEISLSEFHTLPETKKRELKTVADDLGLTVMCCIGLKQEYDFASPEQSVRDAGTEYV
KRLDDCHMLGAPVFAGRTFCAWPQSPPPGMTDKRPYVDRAIDSVRRMIKVAEGH
GIYALEVVNRFQQWLANDAREALAFCDVDNPWCRVQFVRGHLA

Figura 40: SEQ ID NO:26 es otra una psicosa 3-epimerasa de *Burkholderia*.

MVKRFEQWLANDAREALAFCDVDNSWCRVQLDTFHMNIEENSFRDAILACKGRL
GHFHLGEANCLPPGEGRLPWDEIFGALKEIGYDGTIVMEPFMRKGGSVSRAMGVWR
DMSGASDEQMDERARKSLQFARGHLA