

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE D-ALULOSA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[1] La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud estadounidense n.º de serie 62/434 033 presentada el 14 de diciembre de 2016, la cual se incorpora a la presente mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[2] La invención hace referencia a la preparación del azúcar D-alulosa. Más específicamente, la invención hace referencia a métodos para preparar D-alulosa mediante la conversión enzimática de sacáridos (por ejemplo, polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos, sacarosa, D-glucosa y D-fructosa) en D-alulosa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[3] La D-alulosa (también conocida como D-psicosa y, en adelante, alulosa) es un endulzante natural bajo en calorías que tiene 70 % de la dulzura de la sacarosa, pero solamente el 10 % de las calorías. Es un monosacárido hexosa de origen natural que se encuentra presente solo en cantidades pequeñas en trigo y otros vegetales. La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) aprobó el uso de alulosa como aditivo para alimentos en 2012, lo cual indica implica que es generalmente reconocida como segura (GRAS). Sin embargo, debido al costo elevado de la alulosa, su uso como endulzante ha sido limitado. La alulosa tiene una amplia variedad de beneficios para la salud: es hipocalórico (10 % respecto a sacarosa); tiene un índice glucémico muy bajo de 1; se absorbe completamente en el intestino delgado, pero no se metaboliza, sino que se secreta en la orina y las heces; ayuda a regular el azúcar en sangre al inhibir alfa-amilasa, sacarasa y maltasa; y tiene una función similar a la sacarosa en alimentos y bebidas. Como tal, claramente, la alulosa tiene una variedad de aplicaciones en las industrias de alimentos y bebidas.

[4] En la actualidad, la alulosa se produce de forma predominante a través de la isomerización enzimática de fructosa (WO 2014049373). En general, el método se ve afectado por el costo más elevado de materia prima, el costo elevado de la separación de

alulosa de fructosa y el rendimiento relativamente bajo del producto.

[5] Es necesario desarrollar una vía sintética económica de producción de alulosa de rendimiento elevado donde al menos una etapa del proceso implique una reacción química energéticamente favorable. Asimismo, es necesario un proceso de producción donde las etapas del proceso se puedan llevar a cabo en un tanque o biorreactor. También es necesario un proceso de producción de alulosa que se pueda llevar a cabo a una concentración relativamente baja de fosfato, donde se pueda reciclar el fosfato y/o no sea necesario que el proceso use trifosfato de adenosina (ATP) como fuente de fosfato. Además, es necesaria una vía de producción de alulosa que no requiera el uso de la coenzima dinucleótido de adenosina y nicotinamida (NAD(H)) en cualquiera de las etapas de reacción.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[6] Las invenciones descritas en la presente hacen referencia a procesos para preparar alulosa. En varios aspectos, los procesos implican la conversión de 6-fosfato de fructosa (F6P) en 6-fosfato de alulosa (A6P) catalizada por 6-fosfato 3-epimerasa de alulosa (A6PE) y la conversión de A6P en alulosa catalizada por 6-fosfato fosfatasa de alulosa (A6PP). Las invenciones también hacen referencia a alulosa preparada mediante cualquiera de los procesos descritos en la presente.

[7] En algunos aspectos de la invención, un proceso para preparar alulosa también implica la etapa de conversión de 6-fosfato de glucosa (G6P) en F6P, donde fosfoglucoisomerasa (PGI) cataliza la etapa. En otros aspectos, un proceso de síntesis de alulosa también incluye la etapa de conversión de 1-fosfato de glucosa (G1P) en G6P y fosfoglucomutasa (PGM) cataliza esta etapa de conversión.

[8] En varios aspectos, un proceso para preparar alulosa puede involucrar la conversión de un sacárido en G1P catalizada por al menos una enzima; la conversión de G1P en G6P catalizada por fosfoglucomutasa (PGM); la conversión de G6P en F6P catalizada por fosfoglucoisomerasa (PGI); la conversión de F6P en 6-fosfato de alulosa (A6P) catalizada por A6PE y la conversión del A6P producido en alulosa catalizada por A6PP.

[9] Los sacáridos usados en cualesquiera de los procesos se pueden seleccionar del grupo que consiste en un almidón o su derivado, celulosa o su derivado, y sacarosa. El

almidón o su derivado puede ser amilosa, amilopectina, almidón soluble, amilodextrina, maltodextrina, maltosa o glucosa. En algunos aspectos de la invención, un proceso para preparar alulosa implica la conversión de almidón en un derivado de almidón mediante hidrólisis enzimática o mediante hidrólisis ácida de almidón. En otros aspectos, se puede preparar un derivado de almidón mediante hidrólisis enzimática de un almidón catalizada por isoamilasa, pululanasa, alfa-amilasa o una combinación de dos o más de estas enzimas. En determinados aspectos, un proceso para preparar alulosa también puede involucrar la adición de 4-glucano transferasa (4GT).

[10] En varios aspectos un proceso para preparar alulosa puede involucrar la conversión de fructosa en F6P catalizada por al menos una enzima; la conversión de F6P en 6-fosfato de alulosa (A6P) catalizada por A6PE y la conversión del A6P producido en alulosa catalizada por A6PP. En otras modalidades, un proceso de producción de alulosa involucra la conversión de sacarosa en fructosa catalizada por al menos una enzima; la conversión de fructosa en F6P catalizada por al menos una enzima; la conversión de F6P en 6-fosfato de alulosa (A6P) catalizada por A6PE y la conversión del A6P producido en alulosa catalizada por A6PP.

[11] En otros aspectos de la invención, el G6P para usar en un proceso para preparar alulosa se puede generar mediante la conversión de glucosa en G6P catalizada por al menos una enzima. A su vez, se puede producir glucosa mediante la conversión de sacarosa en glucosa catalizada por al menos una enzima.

[12] En otros aspectos de la invención, las etapas de un proceso para preparar alulosa se llevan a cabo sin ATP, sin NAD(H), a una concentración de fosfato de alrededor de 0 mM a alrededor de 150 mM, el fosfato se recicla y/o al menos una etapa del proceso involucra una reacción química energéticamente favorable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[13] Dichos dibujos ilustran determinados aspectos de algunas de las modalidades de la invención y no se deberían usar para limitar o definir la invención.

[14] La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra una vía enzimática de conversión de 6-fosfato de fructosa en 6-fosfato de alulosa y luego, en alulosa.

[15] La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra una vía enzimática de conversión

de almidón o sus productos derivados en alulosa. Se usan las siguientes abreviaturas: α GP, alfa-glucano fosforilasa o fosforilasa de almidón; PGM, fosfoglucomutasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; IA, isoamilasa; PA, pululanasa; MP, maltosa fosforilasa; PPGK, polifosfato glucocinasa.

5 **[16]** La figura 3 muestra una vía enzimática de conversión de celulosa o sus productos derivados en alulosa. CDP, celodextrina fosforilasa; CBP, celobiosa fosforilasa; PPGK, polifosfato glucocinasa; PGM, fosfoglucomutasa; PGI, fosfoglucoisomerasa.

[17] La figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra una vía enzimática de conversión de fructosa en alulosa. PPFK, polifosfato fructocinasa.

10 **[18]** La figura 5 es un diagrama esquemático que ilustra una vía enzimática de conversión de glucosa en alulosa. PPGK, polifosfato glucocinasa; PGI, fosfoglucoisomerasa.

[19] La figura 6 muestra una vía enzimática de conversión de sacarosa o sus productos derivados en alulosa. SP, sacarosa fosforilasa; PPFK, polifosfato fructocinasa; PGM, fosfoglucomutasa; PGI, fosfoglucoisomerasa.

15 **[20]** La figura 7 muestra la energía de Gibbs de reacción entre intermedios con base en la energía de Gibbs de formación para la conversión de 1-fosfato de glucosa en alulosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 **[21]** La invención proporciona vías enzimáticas, o procesos, para la síntesis de alulosa con un rendimiento de producto elevado, al tiempo que reducen en gran medida el costo de separación de productos y el costo de producción de alulosa.

[22] La invención hace referencia a un proceso para la preparación de alulosa donde el proceso involucra la conversión de 6-fosfato de fructosa (F6P) en 6-fosfato de alulosa (A6P) catalizada por una epimerasa y la conversión del A6P producido en alulosa catalizada por
25 una fosfatasa (por ejemplo, 6-fosfato fosfatasa de alulosa, A6PP). Este proceso se muestra generalmente en la Figura 1. En determinadas modalidades, la epimerasa que cataliza la conversión de F6P en A6P es 6-fosfato 3-epimerasa de alulosa (A6PE).

[23] Se pueden usar epimerasas que convierten F6P en A6P en un proceso de la invención. Las epimerasas también pueden convertir A6P en F6P. En algunos aspectos de
30 la invención, las epimerasas adecuadas para uso en los procesos de conversión de F6P en A6P comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con la

secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 o 6 de al menos 45 %, más preferentemente, al menos 50 %, más preferentemente, al menos 55 %, más preferentemente, al menos 60 %, más preferentemente, al menos 65 %, más preferentemente, al menos 70 %, más preferentemente, al menos 75 %, más preferentemente, al menos 80 %, más preferentemente, al menos 85 %, incluso más preferentemente, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 % o al menos 94 %, más preferentemente, al menos 95 % e incluso más preferentemente, al menos 96, 97, 98, 99 o 100 %. Las epimerasas adecuadas son codificadas por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un grado de identidad con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5 de al menos 30 %, preferentemente, al menos 35 %, más preferentemente, al menos 40 %, más preferentemente, al menos 45 %, más preferentemente, al menos 50 %, más preferentemente, al menos 55 %, más preferentemente, al menos 60 %, más preferentemente, al menos 65 %, más preferentemente, al menos 70 %, incluso más preferentemente, al menos 75 %, más preferentemente, al menos 80 %, más preferentemente, al menos 85 %, incluso más preferentemente, al menos 90 %, más preferentemente, al menos 95 % e incluso más preferentemente, al menos 96, 97, 98, 99 o 100 %.

[24] Ejemplos de A6PE incluyen, de modo no taxativo, las siguientes proteínas identificadas por los números de identificación de UNIPROT: D9TQJ4, A0A090IXZ8 y P32719. De estos, D9TQJ4 y A0A090IXZ8 se obtienen de organismos termofílicos. P32719 se obtiene de un organismo mesofílico. P32719 es 53 % idéntica a A0A090IXZ8 y 55 % idéntica a D9TQJ4, y cada proteína cataliza la epimerización de F6P en A6P. Asimismo, A0A090IXZ8 es 45 % idéntica a D9TQJ4. Por el contrario, otras proteínas epimerasa identificadas por los números de identificación de UNIPROT: A0A101D823, R1AXD6, A0A150LBU8, A0A023CQG9 y H1XWY2, las cuales tienen un grado de identidad con D9TQJ4 de 45 % o menos no catalizan la epimerización de F6P en A6P.

[25] En algunos aspectos de la invención, las epimerasas adecuadas para usar en los procesos para convertir F6P en A6P utilizan un cofactor metálico divalente: preferentemente, pero de modo no taxativo, cobalto. En aspectos adicionales de la invención, la epimerasa contiene, de modo no taxativo, dominio de barril (α/β)₈ para catálisis; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene un dominio de unión a fosfato

que incluye una Ser en el extremo de la séptima hebra β del barril, una Ser en el extremo de la octava hebra β del barril y una Gly en el bucle de sitio activo; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene un dominio de unión a metales que incluye una His en la segunda y tercera hebras β del barril; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene una Asp en la segunda y séptima hebras β del barril para actuar como el catalizador ácido/base para una transferencia de protones 1,1 y adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene una cadena His-residuo hidrofóbico-Asp característica en la segunda hebra β del barril donde se utiliza la His en la unión a metales y la Asp para catálisis ácido/base. Estos rasgos se conocen en la técnica y se hace referencia a ellos, por ejemplo, en Chan et ál., «Structural Basis for Substrate Specificity in Phosphate Binding (beta/alpha)₈-Barrels: D-Allulose 6-Phosphate 3-Epimerase from *Escherichia coli* K-12.» *Biochemistry*. 2008; 47 (36); 9608 – 9617. Preferentemente, una epimerasa para usar en los procesos de la invención contiene un dominio de barril (α/β)₈ para catálisis, una Ser en el extremo de la séptima hebra β del barril, una Ser en el extremo de la octava hebra β del barril, una Gly en el bucle de sitio activo, una His en la segunda y tercera hebras β del barril, una Asp en la segunda y séptima hebras β del barril y una cadena His-residuo hidrofóbico-Asp característica en la segunda hebra β del barril.

[26] Los procesos de la invención usan fosfatasas que convierten A6P en alulosa (D-alulosa). En algunos aspectos de la invención, las fosfatasas adecuadas para uso en el proceso de conversión de A6P en alulosa comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 de al menos 45 %, más preferentemente, al menos 50 %, más preferentemente, al menos 55 %, más preferentemente, al menos 60 %, más preferentemente, al menos 65 %, más preferentemente, al menos 70 %, más preferentemente, al menos 75 %, más preferentemente, al menos 80 %, más preferentemente, al menos 85 %, incluso más preferentemente, al menos 90 %, más preferentemente, al menos 95 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 % o al menos 94 %, e incluso más preferentemente, al menos 96, 97, 98, 99 o 100 %. Las epimerasas adecuadas son codificadas por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un grado de identidad con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 7 y 8 de al menos 30 %, preferentemente, al menos 35 %, más preferentemente, al menos 40 %, más preferentemente, al menos 45 %, más

preferentemente, al menos 50 %, más preferentemente, al menos 55 %, más preferentemente, al menos 60 %, más preferentemente, al menos 65 %, más preferentemente, al menos 70 %, incluso más preferentemente, al menos 75 %, más preferentemente, al menos 80 %, más preferentemente, al menos 85 %, incluso más preferentemente, al menos 90 %, más preferentemente, al menos 95 % e incluso más preferentemente, al menos 96, 97, 98, 99 o 100 %.

[27] Ejemplos de A6PP incluyen, de modo no taxativo, las siguientes proteínas identificadas por los números de identificación de UNIPROT: A3DC21, Q5LGR4 y Q89ZR1. A3DC21 es 46 % idéntica a Q5LGR4 y 45 % idéntica a Q89ZR1, y cada proteína cataliza la desfosforilación específica de A6P en alulosa. Por el contrario, otras fosfatasas de la superfamilia de deshidrogenasa de haloácido, proteínas identificadas mediante los números de identificación de UNIPROT: H0UQ29, Q67LU4, A0A0K6IPM3, C8WSJ0, A0A151YX61 y otras, las cuales son menos de 45 % idénticas a A3DC21 no catalizan la desfosforilación específica de A6P en alulosa.

[28] Las fosfatasas para convertir A6P en alulosa adecuadas para usar en los procesos de la invención son específicas para 6-fosfato de alulosa. Tal como se usa en la presente, «específico para 6-fosfato de alulosa» hace referencia a tener una actividad específica mayor en 6-fosfato de alulosa en comparación con 1-fosfato de glucosa, 6-fosfato de glucosa o 6-fosfato de fructosa.

[29] Las fosfatasas para convertir A6P en alulosa utilizan un cofactor metálico divalente, preferentemente, magnesio. En aspectos adicionales de la invención, la fosfatasa contiene, de modo no taxativo, un dominio de plegamiento de Rossmann para catálisis; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene un dominio de terminación C1 para especificidad de sustrato; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene una característica Dx D en la primera hebra β del plegamiento de Rossmann para coordinar magnesio, donde la segunda Asp es un catalizador ácido/base general; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene una Thr o Ser en el extremo de la segunda hebra β del plegamiento de Rossmann que favorece la estabilidad de los intermedios de reacción; adicionalmente, pero de modo no taxativo, contiene una Lys en el extremo N de la hélice α hacia el extremo C de la tercera hebra β del plegamiento de Rossmann que favorece la estabilidad de los intermedios de reacción y adicionalmente, pero de modo no taxativo,

contiene una característica GDxxxD en el extremo de la cuarta hebra β del plegamiento de Rossmann para coordinar magnesio. Estos rasgos se conocen en la técnica y se hace referencia a ellos, por ejemplo, en Burroughs et ál., «Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes.» *J. Mol. Biol.* 2006; 361; 1003–1034. Preferentemente, una fosfatasa para convertir A6P en alulosa usada en los procesos de la invención contiene un dominio de plegamiento de Rossmann para catálisis, un dominio de terminación C1, una característica DxD en la primera hebra β del plegamiento de Rossmann, una Thr o Ser en el extremo de la segunda hebra β del plegamiento de Rossmann, una Lys en el extremo N de la hélice α hacia el extremo C respecto a la tercera hebra β del plegamiento de Rossmann y una característica GDxxxD en el extremo de la cuarta hebra β del plegamiento de Rossmann.

[30] En algunas modalidades, un proceso para preparar alulosa de acuerdo con la invención también incluye la etapa de conversión enzimática de 6-fosfato de glucosa (G6P) en F6P y fosfoglucoisomerasa (PGI) cataliza esta etapa. En otras modalidades, el proceso para preparar alulosa también incluye la etapa de conversión de 1-fosfato de glucosa (G1P) en G6P, donde fosfoglucomutasa (PGM) cataliza la etapa. En incluso modalidades adicionales, el proceso de producción de alulosa también incluye la etapa de conversión de un sacárido en G1P que cataliza al menos una enzima.

[31] Por consiguiente, un proceso para preparar alulosa de acuerdo con la invención puede, por ejemplo, incluir las etapas siguientes: (i) conversión de un sacárido en 1-fosfato de glucosa (G1P) con una o más enzimas; (ii) conversión de G1P en G6P con fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2); (iii) conversión de G6P en F6P con fosfoglucoisomerasa (PGI, EC 5.3.1.9); (iv) conversión de F6P en A6P vía A6PE y (v) conversión de A6P en alulosa vía A6PP. Se ilustra un ejemplo del proceso donde el sacárido es almidón en la Figura 2.

[32] Usualmente, las relaciones de unidades enzimáticas usadas en el proceso descrito son 1:1:1:1:1 (α GP:PGM:PGI:A6PE:A6PP). Para optimizar los rendimientos de productos, es posible ajustar estas relaciones en múltiples combinaciones. Por ejemplo, se puede usar una relación de 3:1:1:1:1 para maximizar la concentración de intermedios fosforilados, lo cual generará un aumento de actividad en las reacciones posteriores. Por el contrario, es

posible usar una relación de 1:1:1:1:3 para mantener un suministro importante de fosfato para α GP, lo cual generará una escisión fosforolítica más eficiente de enlaces alfa-1,4-glucosídicos. Por ejemplo, es posible usar una relación de enzimas de 3:1:1:1:3 para aumentar adicionalmente la velocidad de reacción. Por consiguiente, es posible variar las relaciones entre enzimas, lo que incluye otras enzimas opcionales que se discuten más adelante, para aumentar la eficiencia de la producción de alulosa. Por ejemplo, una enzima particular se puede encontrar presente en una cantidad de alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, etc. con respecto a la cantidad de otras enzimas.

[33] Una de las ventajas importantes de los procesos es que las etapas del proceso se pueden llevar a cabo en un biorreactor o recipiente de reacción. De manera alternativa, también es posible llevar a cabo las etapas en múltiples biorreactores o recipientes de reacción que se dispongan en serie.

[34] Entonces, los iones de fosfato producidos por la desfosforilación de A6P se pueden reciclar en la etapa del proceso de conversión de un sacárido en G1P, particularmente cuando todas las etapas del proceso se llevan a cabo en un único biorreactor o recipiente de reacción. La capacidad de reciclar fosfato en los procesos descritos permite el uso de cantidades no estequiométricas de fosfato, lo cual mantiene las concentraciones de fosfato en la reacción bajas. Esto afecta la vía general y la velocidad general de los procesos, pero no limita la actividad de las enzimas individuales y permite que los procesos de producción de alulosa sean generalmente eficientes.

[35] Por ejemplo, las concentraciones de fosfato en reacción pueden variar de alrededor de 0 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 0 mM a alrededor de 150 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 50 mM, preferentemente, de alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM o más preferentemente, de alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM. Por ejemplo, la concentración de fosfato en reacción puede ser de alrededor de 0,1 mM, alrededor de 0,5 mM, alrededor de 1 mM, alrededor de 1,5 mM, alrededor de 2 mM, alrededor de 2,5 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 6 mM, alrededor de 7 mM, alrededor de 8 mM, alrededor de 9 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 25 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 35 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 45 mM, alrededor de 50 mM o alrededor de 55 mM.

[36] Por consiguiente, una concentración baja de fosfato genera costos de producción

reducidos debido al bajo fosfato total y, por lo tanto, un costo reducido de remoción de fosfato. También previene la inhibición de A6PP mediante concentraciones elevadas de fosfato libre y reduce el potencial de contaminación de fosfato.

[37] Asimismo, los procesos descritos en la presente se pueden llevar a cabo sin ATP agregado como fuente de fosfato, es decir, sin ATP. Los procesos también se pueden llevar a cabo sin tener que agregar NAD(H), es decir, sin NAD(H). Otras ventajas también incluyen el que al menos una etapa de los procesos descritos para producir alulosa implica una reacción química energéticamente favorable (Figura 7).

[38] Ejemplos de las enzimas usadas para convertir un sacárido en G1P incluyen alfa-glucano fosforilasa (α GP, EC 2.4.1.1 lo cual también incluye fosforilasa de maltodextrina, fosforilasa de almidón, glucógeno fosforilasa y otras fosforilasas que degradan enlaces α -1,4 glucosídicos), fosforilasa de maltosa (MP, EC 2.4.1.8), fosforilasa de celodextrina (CDP, EC 2.4.1.49), fosforilasa de celobiosa (CBP, EC 2.4.1.20), fosforilasa de celulosa, fosforilasa de sacarosa (SP, EC 2.4.1.7) y una combinación de estas. La selección de la enzima o combinación de enzimas depende del sacárido usado en el proceso.

[39] Los sacáridos usados para generar G1P pueden ser polisacáridos, oligosacáridos y/o disacáridos. Por ejemplo, el sacárido puede ser almidón, uno o más derivados de almidón, celulosa, uno o más derivados de celulosa, sacarosa, uno o más derivados de sacarosa o una combinación de estos.

[40] El almidón es el compuesto de almacenamiento de energía más ampliamente usado en la naturaleza y se almacena en su mayoría en semillas de vegetales. El almidón natural contiene amilosa lineal y amilopectina ramificada. Ejemplos de derivados de almidón incluyen amilosa, amilopectina, almidón soluble, amilodextrina, maltodextrina, maltosa, fructosa y glucosa. Ejemplos de derivados de celulosa incluyen biomasa pretratada, celulosa amorfa regenerada, celodextrina, celobiosa, fructosa y glucosa. Los derivados de sacarosa incluyen fructosa y glucosa.

[41] Los derivados de almidón se pueden preparar mediante hidrólisis enzimática de almidón o mediante hidrólisis ácida de almidón. Específicamente, la hidrólisis enzimática de almidón se puede catalizar o potenciar mediante isoamilasa (IA, EC. 3.2.1.68), la cual hidroliza enlaces α -1,6-glucosídicos; pululanasa (PA, EC. 3.2.1.41), la cual hidroliza enlaces

α -1,6-glucosídicos; 4- α -glucanotransferasa (4GT, EC. 2.4.1.25), la cual cataliza la transglucosilación de maltooligosacáridos cortos, lo que genera maltooligosacáridos más largos; o alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), la cual escinde enlaces α -1,4-glucosídicos.

[42] Asimismo, es posible preparar derivados de celulosa mediante hidrólisis enzimática de celulosa catalizada por mezclas de celulasa, por ácidos o por pretratamiento de biomasa.

[43] En determinadas modalidades, las enzimas usadas para convertir un sacárido en G1P contienen α GP. En esta etapa, cuando los sacáridos incluyen almidón, el G1P se genera a partir de almidón mediante α GP; cuando los sacáridos contienen almidón soluble, amilodextrina o maltodextrina, el G1P se produce a partir de almidón soluble, amilodextrina o maltodextrina mediante α GP.

[44] Cuando los sacáridos incluyen maltosa y las enzimas contienen fosforilasa de maltosa, el G1P se genera a partir de maltosa mediante fosforilasa de maltosa. Si los sacáridos incluyen sacarosa y las enzimas contienen fosforilasa de sacarosa, el G1P se genera a partir de sacarosa mediante fosforilasa de sacarosa.

[45] En incluso otra modalidad, cuando los sacáridos incluyen celobiosa y las enzimas contienen fosforilasa de celobiosa, el G1P se genera a partir de celobiosa mediante fosforilasa de celobiosa.

[46] En una modalidad adicional, cuando los sacáridos contienen celodextrinas y las enzimas incluyen fosforilasa de celodextrina, el G1P se genera a partir de celodextrina mediante fosforilasa de celodextrina.

[47] En una modalidad alternativa de conversión de un sacárido en G1P, cuando los sacáridos incluyen celulosa y las enzimas contienen fosforilasa de celulosa, el G1P se genera a partir de celulosa mediante fosforilasa de celulosa.

[48] De acuerdo con la invención, la alulosa también se puede producir a partir de fructosa. Un ejemplo del proceso se ilustra en la Figura 4. Por ejemplo, el proceso implica la generación F6P a partir de fructosa y polifosfato catalizada por polifosfato fructocinasa (PPFK), la conversión de F6P en A6P catalizada por A6PE y la conversión de A6P en alulosa catalizada por A6PP. La fructosa se puede producir, por ejemplo, mediante una conversión enzimática de sacarosa.

[49] En otras modalidades, la alulosa se puede producir a partir de sacarosa. Un ejemplo de dicho proceso se ilustra en la Figura 6. El proceso provee una vía sintética *in vitro* que

incluye las siguientes etapas enzimáticas: generación de G1P a partir de sacarosa y fosfato libre catalizada por fosforilasa de sacarosa (SP); conversión de G1P en G6P catalizada por PGM; conversión de G6P en F6P catalizada por PGI; conversión de F6P en A6P catalizada por A6PE y conversión de A6P en alulosa catalizada por A6PP.

5 **[50]** Entonces, los iones de fosfato generados cuando A6P se convierte en alulosa se pueden reciclar en la etapa de conversión de sacarosa en G1P. De manera adicional, tal como se ilustra en la Figura 6, es posible usar PPFK y polifosfato para aumentar los rendimientos de alulosa mediante la producción de F6P a partir de fructosa generada por la escisión fosforolítica de sacarosa mediante SP.

10 **[51]** En algunas modalidades, un proceso para preparar alulosa incluye las siguientes etapas: generación de glucosa a partir de polisacáridos y oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis ácida, conversión de glucosa en G6P catalizada por al menos una enzima, generación de fructosa a partir de polisacáridos y oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis ácida y conversión de fructosa en G6P catalizada por al menos una
15 enzima. Se enumeraron anteriormente ejemplos de los polisacáridos y oligosacáridos.

[52] En otras modalidades, el G6P se produce a partir de glucosa y polifosfato de sodio mediante polifosfato glucocinasa.

[53] La presente descripción provee procesos para convertir sacáridos, tales como polisacáridos y oligosacáridos, en almidón, celulosa, sacarosa y sus productos derivados en
20 alulosa. En determinadas modalidades, se proveen vías enzimáticas libres de ATP artificiales (no naturales) para la conversión de almidón, celulosa, sacarosa y sus productos derivados en alulosa con cócteles enzimáticos libres de células.

[54] Tal como se ilustró anteriormente, es posible usar varias enzimas para hidrolizar almidón para aumentar el rendimiento de G1P. Dichas enzimas incluyen isoamilasa, pululanasa y alfa-amilasa. El almidón de maíz contiene múltiples ramificaciones que
25 impiden la acción de α GP. Es posible usar isoamilasa para desramificar almidón, lo que genera amilodextrina lineal. El almidón pretratado con isoamilasa puede producir una mayor concentración de F6P en el producto final. La isoamilasa y la pululanasa escinden enlaces alfa-1,6-glucosídicos, lo cual hace posible una degradación más completa del almidón
30 mediante alfa-glucano fosforilasa. La alfa-amilasa escinde enlaces alfa-1,4-glucosídicos, por consiguiente, se usa alfa-amilasa para degradar el almidón en fragmentos para una

conversión más rápida en amilosa.

[55] Tal como se ilustra en la Figura 2, se puede usar fosforilasa de maltosa (MP) para aumentar los rendimientos de alulosa mediante la escisión fosforolítica del producto de degradación maltosa en G1P y glucosa. De manera alternativa, es posible usar 4-glucano transferasa (4GT) para aumentar los rendimientos de alulosa al reciclar los productos de degradación glucosa, maltosa y maltotriosa en maltooligosacáridos más largos, los cuales se pueden escindir fosforolíticamente mediante α GP para producir G1P.

[56] De manera adicional, la celulosa es el biorrecurso más abundante y es el componente principal de las paredes de células vegetales. La biomasa lignocelulósica no comestible contiene celulosa, hemicelulosa y lignina, así como otros componentes menores. La celulosa pura, lo que incluye Avicel (celulosa microcristalina), celulosa amorfa regenerada, celulosa bacteriana, papel de filtro, entre otras, se pueden preparar mediante una serie de tratamientos. Los sustratos celulósicos parcialmente hidrolizados incluyen ciclodextrinas insolubles en agua cuyo grado de polimerización es mayor de 7, celodextrinas solubles en agua con un grado de polimerización de 3-6, celobiosa, glucosa y fructosa.

[57] En determinadas modalidades, la celulosa y sus productos derivados se pueden convertir en alulosa a través de una serie de etapas. Un ejemplo de dicho proceso se ilustra en la Figura 3. El proceso provee una vía sintética *in vitro* que involucra las siguientes etapas: generación de G1P a partir de celodextrina y celobiosa y fosfato libre catalizada por fosforilasa de celodextrina (CDP) y fosforilasa de celobiosa (CBP), respectivamente; conversión de G1P en G6P catalizada por PGM; conversión de G6P en F6P catalizada por PGI; conversión de F6P en A6P catalizada por A6PE y conversión de A6P en alulosa catalizada por A6PP. En este proceso, es posible reciclar los iones de fosfato mediante la etapa de conversión de celodextrina y celobiosa en G1P.

[58] Es posible usar varias enzimas para hidrolizar celulosa sólida en celobiosa y celodextrinas solubles en agua. Dichas enzimas incluyen endoglucanasa y celobiohidrolasa, pero no incluyen beta-glucosidasa (celobiasa).

[59] Antes de la hidrólisis de celulosa y la generación de G1P, la celulosa y biomasa se pueden pretratar para aumentar su reactividad y reducir el grado de polimerización de cadenas de celulosa. Los métodos de pretratamiento de biomasa y celulosa incluyen pretratamiento con ácido diluido, fraccionamiento con lignocelulosa a base de solvente de

celulosa, expansión de fibras de amoníaco, remojo en amoníaco acuoso, tratamiento con líquido iónico e hidrólisis parcial mediante el uso de ácidos concentrados, lo que incluye ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y sus combinaciones.

[60] En algunas modalidades, es posible agregar polifosfato y polifosfato glucocinasa (PPGK) al proceso, lo que aumenta los rendimientos de alulosa mediante la fosforilación del producto de degradación de glucosa en G6P, tal como se ilustra en la Figura 3.

[61] En otras modalidades, la alulosa se puede generar a partir de glucosa. Un ejemplo de dicho proceso se ilustra en la Figura 5. El proceso involucra las etapas de generación de G6P a partir de glucosa y polifosfato catalizada por polifosfato glucocinasa (PPGK); conversión de G6P en F6P catalizada por PGI; conversión de F6P en A6P catalizada por una enzima y conversión de A6P en alulosa catalizada por A6PP.

[62] Es posible usar cualquier amortiguador biológico adecuado conocido en la técnica en un proceso de la invención, tal como HEPES, PBS, BIS-TRIS, MOPS, DIPSO, Trizma, etc. El amortiguador de reacción para todas las modalidades puede tener un pH que varía de 5,0-8,0. Más preferentemente, el pH del amortiguador de reacción puede variar de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,3. Por ejemplo, el pH del amortiguador de reacción puede ser 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2 o 7,3.

[63] El amortiguador de reacción también puede contener cationes metálicos clave. Ejemplos de iones metálicos incluyen Mg^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} .

[64] La temperatura de reacción a la que se llevan a cabo las etapas del proceso puede variar de 37-85 °C. Más preferentemente, las etapas se pueden llevar a cabo a una temperatura que varía de alrededor de 40 °C a alrededor de 70 °C. La temperatura puede ser, por ejemplo, alrededor de 40 °C, alrededor de 45 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 55 °C o alrededor de 60 °C. Preferentemente, la temperatura de reacción es alrededor de 50 °C.

[65] El tiempo de reacción de los procesos descritos se puede ajustar según sea necesario y puede variar de alrededor de 8 horas a alrededor de 48 horas. Por ejemplo, el tiempo de reacción puede ser alrededor de 16 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 26 horas, alrededor de 28 horas, alrededor de 30 horas, alrededor de 32 horas, alrededor de 34 horas, alrededor de 36 horas, alrededor de 38 horas, alrededor de 40 horas, alrededor de 42 horas, alrededor de 44

horas, alrededor de 46 horas o alrededor de 48 horas. Más preferentemente, el tiempo de reacción es alrededor de 24 horas.

[66] El proceso de acuerdo con la invención puede lograr rendimientos elevados debido a la constante de equilibrio muy favorable para la reacción general. Teóricamente, se pueden lograr rendimientos de hasta 99 % si el material de partida se convierte completamente en un intermedio.

[67] Los procesos de la invención usan materiales de partida económicos y reducen los costos de producción al disminuir los costos asociados a la separación de materia prima y producto. Almidón, celulosa, sacarosa y algunos de sus derivados son materias primas más económicas que, por ejemplo, fructosa. Cuando la alulosa se produce a partir de fructosa, los rendimientos son menores que en la presente invención y la alulosa se debe separar de la fructosa mediante cromatografía, lo que lleva a costos de producción más elevados.

[68] Asimismo, la etapa de conversión de A6P en alulosa de acuerdo con la invención es una reacción de fosfatasa irreversible, independientemente de la materia prima. Por lo tanto, la alulosa se produce con un rendimiento muy alto al tiempo que minimiza de forma eficaz los costos de separación de producto posterior.

[69] A diferencia de los métodos de producción con base celular, la invención implica una preparación libre de células de alulosa, presenta tasas de reacción relativamente elevadas debido a la eliminación de la membrana celular, lo que suele enlentecer el transporte de sustrato/producto hacia el interior y el exterior de la célula. Asimismo, tiene un producto final libre de metabolitos celulares/medio de fermentación rico en nutrientes.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

[70] Productos químicos

[71] Todos los productos químicos, los que incluyen almidón de maíz, almidón soluble, maltodextrinas, maltosa, glucosa, papel de filtro fueron de grado reactivo o más elevado y se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) o Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EUA), salvo que se indique de otra manera. Las enzimas de restricción, T4 ligasa y ADN polimerasa Phusion se adquirieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). Los

oligonucleótidos se sintetizaron ya sea mediante Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA) o Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, EUA). La secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO 1, codifica A6PE termofílica de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4). La SEQ ID NO 2 es una versión optimizada con codones de dicha secuencia de nucleótidos. La SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácido para la enzima. La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 4 codifica A6PE termofílica de *Bacillus thermoamylovorans* (UNIPROT ID A0A090IXZ8). La SEQ ID NO 5 es una versión optimizada con codones de dicha secuencia de nucleótidos. La SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácido para la enzima. La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 7 codifica A6PP termofílico de *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DC21). La SEQ ID NO:8 es una versión optimizada con codones de la secuencia de nucleótidos. La SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácido que corresponde a la enzima. La celulosa amorfa regenerada que se usa en la purificación de enzimas se preparó a partir de Avicel PH105 (FMC BioPolymer, Filadelfia, PA, EUA) mediante su disolución y regeneración, tal como se describe en: Ye et ál., «Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of *Clostridium thermocellum* cellodextrin phosphorylase on insoluble cellulose». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 92:551-560. Se usó *Escherichia coli* Sig10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como una célula hospedadora para la manipulación de ADN y se usó *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como una célula hospedadora para la expresión de proteínas recombinantes. Se usó el medio ZYM-5052 que incluye 100 mg L⁻¹ de ampicilina o 50 mg L⁻¹ de kanamicina para el crecimiento celular de *E. coli* y la expresión de proteínas recombinantes. Se adquirieron celulasa de *Trichoderma reesei* (número de catálogo: C2730) y pululanasa (número de catálogo: P1067) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y Novozymes (Franklinton, NC, EUA) las produjo. Se adquirió maltosa fosforilasa (número de catálogo: M8284) de Sigma-Aldrich.

[72] Producción y purificación de enzimas recombinantes

[73] La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que contiene un plásmido de expresión de proteínas se incubó en un matraz Erlenmeyer de 1L con 100 mL de medio ZYM-5052 que contiene 100 mg L⁻¹ de ampicilina o 50 mg L⁻¹ de kanamicina. Las células se cultivaron a 30 °C con agitación giratoria a 220 rpm durante 16-24 horas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 12 °C y se lavaron una vez con HEPES 20 mM (pH 7,5) que contiene NaCl

50 mM y MgCl_2 5 mM (módulo de unión a celulosa y precipitación con calor) o HEPES 20 mM (pH 7,5) que contiene NaCl 300 mM e imidazol 5 mM (purificación con Ni). Los sedimentos celulares se volvieron a suspender en la misma solución amortiguadora y se lisaron mediante ultrasonificación (desmembrador sónico modelo 500 de Fisher Scientific; pulso de 5 s encendido y 10 s apagado, 21 min en total a 50 % de amplitud). Luego de la centrifugación, se purificaron las proteínas diana en los sobrenadantes.

[74] Se usaron tres enfoques para purificar las diversas proteínas recombinantes. Las proteínas etiquetadas con His se purificaron mediante la resina cargada con Ni Profinity IMAC (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Las proteínas de fusión que contienen un módulo de unión a celulosa (CBM) e inteína de autoescisión se purificaron mediante adsorción de alta afinidad en una celulosa amorfa regenerada de área de superficie grande. Se usó la precipitación con calor a 70-95 °C durante 5-30 min para purificar enzimas hipermoestables. Se examinó la pureza de las proteínas recombinantes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se purificó A6PE con CoCl_2 80 μM presente en medios de cultivo, amortiguadores de elución, amortiguador de diálisis y amortiguador de almacenamiento de proteínas.

[75] Enzimas utilizadas y sus ensayos de actividad

[76] Se usó *alfa-glucano fosforilasa* (αGP) de *Thermotoga maritima* (UNIPROT ID G4FEH8). Se evaluó la actividad en amortiguador de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 1 mM, DTT 5 mM y maltodextrina 30 mM a 50 °C. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO) (Vivaproducts, Inc., Littleton, MA, EUA). Se midió 1-fosfato de glucosa (G1P) mediante el uso de un kit de ensayo de glucosa hexocinasa/G6PDH (Sigma Aldrich, n.º de catálogo GAHK20-1KT) complementado con 25 U/mL de fosfoglucomutasa. Una unidad (U) se describe como $\mu\text{mol/min}$.

[77] Se usó *fosfoglucomutasa* (PGM) de *Thermococcus kodakaraensis* (UNIPROT ID Q68BJ6). Se midió la actividad en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 5 mM y G1P 5 mM a 50 °C. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se determinó el producto 6-fosfato de glucosa (G6P) mediante el uso de un kit de ensayo de hexocinasa/G6PDH (Sigma Aldrich, n.º de catálogo GAHK20-1KT).

[78] Se usaron dos fuentes distintas de fosfoglucoisomerasa (PGI) de *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DBX9) y *Thermus thermophilus* (UNIPROT ID Q5SLL6). Se midió la actividad en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 5 mM y G6P 10 mM a 50 °C. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se determinó el producto, 6-fosfato de fructosa (F6P), mediante el uso de un ensayo enzimático acoplado de 6-fosfato de fructosa cinasa (F6PK)/piruvato deshidrogenasa (PK)/lactato deshidrogenasa (LD), donde una reducción de absorbancia a 340 nm indica la producción de F6P. Esta reacción de 200 μL contenía HEPES 50 mM (pH 7,2), MgCl_2 5 mM, G6P 10 mM, ATP 1,5 mM, fosfoenolpiruvato 1,5 mM, NADH 200 μM , 0,1 U de PGI, 5 U de PK y 5 U de LD.

[79] Se usó 6-fosfato 3-epimerasa de alulosa (A6PE) de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4), SEQ ID NO 3. Se midió la actividad en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM , 1 U/mL de A6PP y F6P 10 mM a 50 °C. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se determinó el producto, 6-fosfato de alulosa (A6P), mediante el uso de 6-fosfato fosfatasa de alulosa y se detectó la liberación de fosfato libre. Para detectar la liberación de fosfato libre, se agregaron 500 μL de una solución que contiene acetato de cinc 0,1 M y molibdato de amonio 2 mM (pH 5) a 50 μL de reacción. Esto se mezcló y se continuó con 125 μL de ácido ascórbico al 5 % (pH 5). Esta solución se mezcló y luego se incubó a 30 °C durante 20 minutos. Se interpretó que la absorbancia a 850 nm determina la liberación de fosfato libre.

[80] Se usó 6-fosfato fosfatasa de alulosa (A6PP) de *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DC21), SEQ ID NO 9. Se midió la actividad en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM , 1 U/mL de A6PE y F6P 10 mM a 50 °C. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). El producto, alulosa, se determinó mediante la detección de la liberación de fosfato libre tal como se describe para A6PE.

[81] La celodextrina fosforilasa recombinante y la celobiosa fosforilasa de *C. thermocellum* se describen en Ye et ál. «Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails». *ChemSusChem* 2009; 2:149-152. Sus actividades se sometieron a ensayos tal como se describió.

[82] La polifosfato glucocinasa recombinante de *Thermobifida fusca* YX se describe en Liao et ál., «One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 93:1109-1117. Sus actividades se sometieron a ensayos tal como se describió.

[83] La isoamilasa recombinante de *Sulfolobus tokodaii* se describe en Cheng et ál., «Doubling power output of starch biobattery treated by the most thermostable isoamylase from an archaeon *Sulfolobus tokodaii*». *Scientific Reports* 2015; 5:13184. Sus actividades se sometieron a ensayos tal como se describió.

[84] La 4-alfa-glucanoltransferasa recombinante de *Thermococcus litoralis* se describe en Jeon et ál. «4- α -Glucanotransferase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus Litoralis*». *Eur. J. Biochem.* 1997; 248:171-178. Su actividad se midió tal como se describió.

[85] Se usó sacarosa fosforilasa de *Caldithrix abyssi* (UNIPROT H1XT50). Su actividad se midió en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,5) que contiene sacarosa 10 mM y fosfato orgánico 12 mM. Se midió 1-fosfato de glucosa (G1P) mediante el uso de un kit de ensayo de glucosa hexocinasa/G6PDH complementado con 25 U/mL de fosfoglucomutasa, al igual que con alfa-glucano fosforilasa.

[86] Las unidades de enzimas usadas en cada Ejemplo a continuación se pueden aumentar o reducir para ajustar el tiempo de reacción según sea deseado. Por ejemplo, si uno quisiera realizar el Ejemplo 9 en 8 h en lugar de 24 h, se aumentarían las unidades de las enzimas alrededor de 3 veces. Por el contrario, si uno quisiera realizar el Ejemplo 9 en 48 h en lugar de 24 h, se podrían reducir las unidades de enzimas alrededor de 2 veces. Estos ejemplos ilustran cómo se puede usar la cantidad de unidades de enzimas para aumentar o reducir el tiempo de reacción mientras que la productividad se mantiene constante.

[87] Ejemplo 1

[88] A efectos de validar la viabilidad técnica de la biosíntesis enzimática de 6-fosfato de fructosa de almidón, se expresaron de forma recombinante tres enzimas: alfa-glucano fosforilasa de *T. maritima* (UNIPROT ID G4FEH8), fosfoglucomutasa de *Thermococcus kodakaraensis* (UNIPROT ID Q68BJ6) y fosfoglucoisomerasa de *Clostridium thermocellum*

(UNIPROT ID A3DBX9). Las proteínas recombinantes se sobreexpresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron tal como se describe anteriormente.

[89] Se incubó una mezcla de reacción de 0,20 mL que contiene 10 g/L de almidón soluble, solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, ZnCl_2 0,5 mM, 0,01 U de α GP, 0,01 U de PGM y 0,01 U PGI a 50 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se determinó el producto, 6-fosfato de fructosa (F6P), mediante el uso de un ensayo enzimático acoplado de 6-fosfato de fructosa cinasa (F6PK)/piruvato deshidrogenasa (PK)/lactato deshidrogenasa (LD), donde una reducción de absorbancia a 340 nm indica la producción de F6P, tal como se describe anteriormente. La concentración final de F6P luego de 24 horas fue 3,6 g/L.

[90] Ejemplo 2

[91] Se llevaron a cabo las mismas pruebas que en el Ejemplo 1 (con distintas temperaturas de reacción) de 40 a 80 °C. Se descubrió que 10 g/L de almidón soluble produjo 0,9 g/L de F6P a 40 °C y 3,6 g/L de F6P a 80 °C luego de reacciones de 40 horas. Estos resultados sugieren que aumentar la temperatura de reacción para este conjunto de enzimas aumentó los rendimientos de F6P, pero una temperatura muy elevada puede afectar alguna actividad enzimática.

[92] Ejemplo 3

[93] Se descubrió que, a 80°C, una relación de unidad de enzima de α GP:PGM:PGI de aproximadamente 1:1:1 resultó en generación de F6P rápida. Se observó que la relación de enzimas no influyó en gran medida en la concentración final de F6P si el tiempo de reacción fue lo suficientemente largo. Sin embargo, la relación de enzimas afecta las tasas de reacción y el costo total de enzimas usadas en el sistema.

[94] Ejemplo 4

[95] Se incubó una mezcla de reacción de 0,20 mL que contiene 10 g/L de maltodextrina, solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, ZnCl_2 0,5 mM, 0,01 U de α GP, 0,01 U de PGM y 0,01 U PGI a 50 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se determinó el producto, 6-fosfato de fructosa (F6P), mediante el uso de un ensayo enzimático acoplado de 6-fosfato de fructosa cinasa (F6PK)/piruvato deshidrogenasa (PK)/lactato

deshidrogenasa (LD), donde una reducción de absorbancia a 340 nm indica la producción de F6P, tal como se describe anteriormente. La concentración final de F6P luego de 24 horas fue 3,6 g/L.

[96] Ejemplo 5

5 **[97]** Para evaluar la producción de F6P de Avicel, se usó celulosa de Sigma para hidrolizar la celulosa a 50 °C. Para remover la beta-glucosidasa de la celulasa comercial, se mezclaron 10 unidades de papel de filtro/mL de celulasa con 10 g/L de Avicel en un baño de agua helada durante 10 min. Luego de la centrifugación a 4 °C, se decantó el sobrenadante que contiene beta-glucosidasa. Se volvió a suspender el Avicel unido a celulasa que
10 contiene endoglucanasa y celobiohidrolasa en una solución amortiguadora de citrato (pH 4,8) para su hidrólisis a 50 °C durante tres días. La celulosa hidrolizada se mezcló con 5 U/mL de celodextrina fosforilasa, 5 U/L de celobiosa fosforilasa, 5 U/mL de α GP, 5 U/mL de PGM y 5 U/mL de PGI en una solución amortiguadora de HEPES 100 mM (pH 7,2) que contiene fosfato 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM y $ZnCl_2$ 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo a 60 °C
15 durante 72 horas y se encontraron concentraciones elevadas de F6P (cantidades pequeñas de glucosa y nulas de celobiosa). Se detectó F6P mediante el uso del ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. La glucosa se detectó mediante el uso de un kit de ensayo de hexocinasa/G6PDH tal como se describió anteriormente.

[98] Ejemplo 6

20 **[99]** Con el fin de aumentar los rendimientos de F6P a partir de Avicel, se trató previamente Avicel con ácido fosfórico concentrado para producir celulosa amorfa (RAC), tal como se describe en Zhang et ál. «A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure». *Biomacromolecules* 2006; 7:644-648. Para remover la beta-glucosidasa de la
25 celulasa comercial, se mezclaron 10 unidades de papel de filtro/mL de celulasa con 10 g/L de RAC en un baño de agua helada durante 5 min. Luego de la centrifugación a 4 °C, se decantó el sobrenadante que contiene beta-glucosidasa. Se volvió a suspender el RAC unido a celulasa que contiene endoglucanasa y celobiohidrolasa en una solución amortiguadora de citrato (pH 4,8) para su hidrólisis a 50 °C durante 12 horas. El RAC
30 hidrolizado se mezcló con 5 U/mL de celodextrina fosforilasa, 5 U/L de celobiosa fosforilasa, 5 U/mL de α GP, 5 U/mL de PGM y 5 U/mL de PGI en una solución amortiguadora de HEPES

100 mM (pH 7,2) que contiene fosfato 10 mM, MgCl_2 5 mM y ZnCl_2 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo a 60 °C durante 72 horas. Se recuperaron concentraciones elevadas de F6P y glucosa porque no se agregaron enzimas para convertir glucosa en F6P. Se detectó F6P mediante el uso del ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. La glucosa se detectó mediante el uso de un kit de ensayo de hexocinasa/G6PDH tal como se describió anteriormente.

[100] Ejemplo 7

[101] Para aumentar adicionalmente los rendimientos de F6P de RAC, se agregaron polifosfato glucocinasa y polifosfato. Para remover la beta-glucosidasa de la celulasa comercial, se mezclaron 10 unidades de papel de filtro/mL de celulasa con 10 g/L de RAC en un baño de agua helada durante 5 min. Luego de la centrifugación a 4 °C, se decantó el sobrenadante que contiene beta-glucosidasa. Se volvió a suspender el RAC unido a celulasa que contiene endoglucanasa y celobiohidrolasa en una solución amortiguadora de citrato (pH 4,8) para su hidrólisis a 50 °C y se incubó en una solución amortiguadora de citrato (pH 4,8) para su hidrólisis a 50 °C durante 12 horas. El RAC hidrolizado se mezcló con 5 U/mL de polifosfato glucocinasa, 5 U/mL de celodextrina fosforilasa, 5 U/mL de celobiosa fosforilasa, 5 U/mL de α GP, 5 U/mL de PGM y 5 U/mL de PGI en una solución amortiguadora de HEPES 100 mM (pH 7,2) que contiene polifosfato 50 mM, fosfato 10 mM, MgCl_2 5 mM y ZnCl_2 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 72 horas. Se encontró F6P en concentraciones elevadas solo con pequeñas cantidades de glucosa presentes actualmente. Se detectó F6P mediante el uso del ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. La glucosa se detectó mediante el uso de un kit de ensayo de hexocinasa/G6PDH tal como se describió anteriormente.

[102] Ejemplo 8

[103] Para validar la producción de alulosa de F6P, se mezclaron 2 g/L de F6P con 1 U/ml de A6PE y 1 U/ml de A6PP en solución amortiguadora de HEPES 50 mM (pH 7,2) que contiene MgCl_2 5 mM y CoCl_2 80 μM . La reacción se incubó durante 6 horas a 50 °C. Se observó una conversión de 99 % de F6P en alulosa a través de HPLC (Agilent serie 1100) con una columna Agilent Hi-Plex H y un detector de índice de refracción. La muestra se corrió en H_2SO_4 5 mM a 0,6 mL/min.

[104] Ejemplo 9

[105] Para validar la producción de alulosa de maltodextrina, se incubó una mezcla de reacción de 0,20 mL que contiene 20 g/L de maltodextrina, solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM , 0,05 U de αGP , 0,05 U de PGM, 0,05 U de PGI, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La reacción se detiene mediante filtración de enzima con un concentrador Vivaspin 2 (10 000 MWCO). Se detecta y se cuantifica la alulosa mediante el uso de HPLC Agilent serie 1100 con detector del índice de refracción y una columna Agilent Hi-Plex H. La fase móvil es H_2SO_4 5 mM que corre a 0,6 mL/min. Se usan estándares de varias concentraciones de alulosa para cuantificar el rendimiento obtenido.

[106] Ejemplo 10

Se incubó una mezcla de reacción que contiene 200 g/L de maltodextrina, solución amortiguadora de acetato 10 mM (pH 5,5), MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM y 0,1 g/L de isoamilasa a 80 °C durante 24 horas. Esto se usó para crear otra mezcla de reacción que contiene 20 g/L de maltodextrina tratada con isoamilasa, se incubó solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, 0,05 U de αGP , 0,05 U de PGM, 0,05 U de PGI, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[107] Ejemplo 11

Se incubó una mezcla de reacción que contiene 200 g/L de maltodextrina, solución amortiguadora de acetato 10 mM (pH 4,5), MgCl_2 5 mM y una dilución 1:200 de pululanasa D6 de Novozymes a 50 °C durante 4 horas. Esto se usa para crear otra mezcla de reacción que contiene 20 g/L de maltodextrina tratada con pululanasa, se incubó solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM , 0,05 U de αGP , 0,05 U de PGM, 0,05 U de PGI, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[108] Ejemplo 12

[109] Para aumentar adicionalmente los rendimientos de alulosa de maltodextrina, se agregan 0,05 U de 4-glucano transferasa (4GT) a la reacción descrita en el Ejemplo 9.

[110] Se incubó una mezcla de reacción de 0,2 mL que contiene 20 g/L de maltodextrina tratada con isoamilasa (ver el Ejemplo 9), solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, CoCl_2 80 μM , 0,05 U de αGP , 0,05 U de PGM, 0,05 U de PGI, 0,05 U de

A6PE, 0,05 U de A6PP y 0,05 U de 4GT a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[111] Ejemplo 13

[112] Para determinar el intervalo de concentración de la solución salina amortiguada con fosfato (PBS), se incubó una mezcla de reacción de 0,20 mL que contiene 50 g/L de maltodextrina; solución salina amortiguada con fosfato 6,25 mM, 12,5 mM, 25 mM, 37,5 mM o 50 mM pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; 0,1 U de aGP; 0,1 U de PGM y 0,1 U de PGI a 50 °C durante 6 horas. La corta duración garantiza que no se llegue a su finalización y, por lo tanto, es posible observar claramente las diferencias de eficacia. Se cuantificó la producción de F6P mediante el uso de un ensayo enzimático acoplado de 6-fosfato de fructosa cinasa (F6PK)/piruvato deshidrogenasa (PK)/lactato deshidrogenasa (LD), donde una reducción de absorbancia a 340 nm indica la producción de F6P. Respectivamente, se obtiene un rendimiento de 4,5 g/L, 5,1 g/L, 5,6 g/L, 4,8 g/L o 4,9 g/L de F6P para las reacciones que contienen solución salina amortiguada con fosfato 6,25 mM, 12,5 mM, 25 mM, 37,5 mM o 50 mM pH 7,2 (Tabla 1). Estos resultados indican que una concentración de PBS de 25 mM a pH 7,2 es ideal para estas condiciones de reacción específicas. Es importante observar que incluso el uso de PBS 6,25 mM a pH 7,2 resulta en un recambio significativo debido al reciclaje de fosfato. Esto demuestra que los métodos de reciclaje de fosfato descritos son capaces de mantener bajos los niveles de fosfato incluso en niveles industriales de productividad volumétrica (por ejemplo, 200-300 g/L de maltodextrina).

Tabla 1

Concentración de PBS pH 7,2 (mM)	g/L de F6P
6,25	4,5
12,5	5,1
25	5,6
37,5	4,8
50	4,9

[113] Ejemplo 14

[114] Para determinar el intervalo de pH de la reacción en cascada, se incubó una mezcla de reacción de 0,20 mL que contiene 50 g/L de maltodextrina; solución salina amortiguada

con fosfato 50 mM pH 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2 o 7,3; MgCl₂ 5 mM; 0,02 U de α GP; 0,02 U de PGM y 0,02 U de PGI a 50 °C durante 16 horas. Se disminuyen las unidades para garantizar que no se llegue a su finalización y, por lo tanto, es posible observar claramente las diferencias de eficacia. La producción de F6P se cuantifica como en el Ejemplo 12.

- 5 Respectivamente, se obtuvo un rendimiento de 4,0 g/L, 4,1 g/L, 4,2 g/L, 4,1 g/L, 4,4 g/L, 4,1 g/L, 3,8 g/L o 4,0 g/L de F6P para las reacciones que contienen solución salina amortiguada con fosfato 50 mM a pH 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2 o 7,3 (Tabla 2). Estos resultados indican que un pH de 6,8 es ideal para estas condiciones de reacción específicas, aunque el sistema funcione dentro de un intervalo de pH amplio.

10 Tabla 2

pH de PBS	g/L de F6P
6,0	4,0
6,2	4,1
6,4	4,2
6,6	4,1
6,8	4,4
7,0	4,1
7,2	3,8
7,3	4,0

[115] Ejemplo 15

- 15 [116] Para investigar el aumento, se incubó una mezcla de reacción de 20 mL que contiene 50 g/L de maltodextrina tratada con isoamilasa (ver el Ejemplo 10), solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,2, MgCl₂ 5 mM, CoCl₂ 80 μ M, 10 U de α GP, 10 U de PGM, 10 U de PGI, 10 U de A6PE y 10 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantificó como en el Ejemplo 9.

[117] Ejemplo 16

- 20 [118] Para aumentar adicionalmente los rendimientos de alulosa de maltodextrina, se agregan 0,05 U de maltosa fosforilasa a la reacción descrita en el Ejemplo 9.

[119] Ejemplo 17

- [120] Para aumentar adicionalmente los rendimientos de alulosa de maltodextrina, se

agregan 0,05 U de polifosfato glucocinasa y polifosfato 75 mM a la reacción descrita en el Ejemplo 9.

[121] Ejemplo 18

[122] Para producir alulosa a partir de fructosa, se incubó una mezcla de reacción que contiene 10 g/L de fructosa, solución amortiguadora de Tris 50 mM pH 7,0, polifosfato 75 mM, MgCl₂ 5 mM, CoCl₂ 80 µM, 0,05 U de fructosa polifosfato cinasa, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[123] Ejemplo 19

[124] Para producir alulosa a partir de glucosa, se incubó una mezcla de reacción que contiene 10 g/L de glucosa, solución amortiguadora de Tris 50 mM pH 7,0, polifosfato 75 mM, MgCl₂ 5 mM, CoCl₂ 80 µM, 0,05 U de glucosa polifosfato cinasa, 0,05 U de PGI, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[125] Ejemplo 20

[126] Para producir alulosa a partir de sacarosa, se incubó una mezcla de reacción que contiene 10 g/L de sacarosa, solución salina amortiguada con fosfato 50 mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, CoCl₂ 80 µM, 0,05 U de sacarosa fosforilasa, 0,05 PGM, 0,05 U de PGI, 0,05 U de A6PE y 0,05 U de A6PP a 50 °C durante 24 horas. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.

[127] Ejemplo 21

[128] Para aumentar adicionalmente los rendimientos de alulosa de sacarosa, se agregan polifosfato 75 mM y 0,05 polifosfato fructocinasa a la mezcla de reacción en el Ejemplo 20. La producción de alulosa se cuantifica como en el Ejemplo 9.