

ENZIMA DE DESFOSFORILACIÓN DEL NUEVO ÁCIDO PSICOSA-6-FOSFÓRICO,
COMPOSICIÓN PARA PRODUCIR PSICOSA QUE COMPRENDE LA MISMA Y
MÉTODO PARA PREPARAR PSICOSA USANDO LA MISMA

5

CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere a una novedosa enzima para la desfosforilación de psicosa-6-fosfato para la producción de psicosa, a una composición para la producción de psicosa que incluye la misma y a un procedimiento para la producción de psicosa mediante el uso de la misma.

10

TÉCNICA ANTECEDENTE

La D-psicosa-3-epimerasa (EC 5.1.3.30) y la D-tagatosa-3-epimerasa (EC 5.1.3.31) son conocidas como enzimas que catalizan la 3-epimerización de D-fructosa para producir D-psicosa. Cuando la D-psicosa es producida a través de una sola reacción enzimática mediante el uso de la enzima, el equilibrio de reacción entre el sustrato (es decir, D-fructosa) y el producto (es decir, D-psicosa) existe a un nivel constante (producto/sustrato = apropiadamente 20-35%). Por lo tanto, la producción de D-psicosa de alta pureza requiere un proceso adicional para separar y eliminar una concentración relativamente alta de D-fructosa del producto de reacción enzimática. Además, la fructosa es una materia prima relativamente costosa en comparación con el almidón o la glucosa, y cuando se usa fructosa como materia prima, aumenta la relación de costo de psicosa y tagatosa. Por consiguiente, se han reportado varios estudios sobre la producción de alulosa y tagatosa mediante una reacción con almidón o glucosa, que es una materia prima relativamente económica (KR 10-2018-0004023, WO 2018-112139, WO 2017-059278, WO 2018-129275).

Mientras tanto, Chan et al. (2008. *Biochemistry*. 47:9608-9617) reportaron D-ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa (EC 5.1.3.1) derivada de *Streptococcus pyogenes* y D-psicosa-6-fosfato-3-epimerasa (EC 5.1.3.-) derivado de *E. coli* capaz de catalizar la 3-epimerización de D-fructosa-6-fosfato y D-psicosa-6-fosfato. Sin embargo, estas enzimas no son aplicables industrialmente debido a su escasa resistencia térmica.

30

DIVULGACIÓN

Problema técnico

En tales circunstancias, los presentes inventores han realizado una investigación seria para desarrollar un procedimiento para aumentar la tasa de conversión de alulosa a

35

escala industrial de una manera económica. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que después de que la sacarosa o el almidón (por ejemplo, maltodextrina) como materia prima económica se convierte en psicosa-6-fosfato, el uso de la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud, que es específico de psicosa-6-fosfato y participa en una vía de reacción irreversible, permite la producción de psicosa a través de conversiones enzimáticas de un solo recipiente utilizando una pluralidad de enzimas involucradas en las vías de producción de psicosa y puede aumentar significativamente la tasa de conversión a psicosa. Por consiguiente, la presente solicitud se ha realizado basándose en este hallazgo. La enzima de la presente solicitud presenta mejores ventajas en la producción de psicosa en comparación con la psicosa-6-fosfato fosfatasa conocida convencionalmente (Vista panorámica de una superfamilia de fosfatasas mediante perfilado de sustrato, *PNAS*, 06.04.2015, Huang, etc.).

Solución técnica

Es un objeto de la presente solicitud proporcionar una psicosa-6-fosfato fosfatasa. Otro objeto de la presente solicitud es proporcionar un ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa.

Otro objeto adicional de la presente solicitud es proporcionar un transformante que incluye el ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa.

Otro objeto adicional de la presente solicitud es proporcionar una composición para la producción de psicosa, que incluye la psicosa-6-fosfato fosfatasa, un microorganismo que expresa la misma o un cultivo del microorganismo.

Es incluso otro objeto de la presente solicitud proporcionar un procedimiento para la producción de psicosa, que incluye convertir psicosa-6-fosfato en psicosa poniendo psicosa-6-fosfato en contacto con la psicosa-6-fosfato fosfatasa, un microorganismo que expresa la misma o un cultivo del microorganismo.

Efectos ventajosos

Las novedosas enzimas y combinaciones de las mismas de la presente solicitud son termorresistentes y, por consiguiente, la enzima de la presente solicitud puede participar en la vía para la conversión de psicosa-6-fosfato en psicosa de manera industrial, permite la progresión de la vía para la síntesis de psicosa a partir de glucosa o almidón (p. ej., maltodextrina) como materia prima económica, y permite la producción de psicosa a través de la desfosforilación de psicosa-6-fosfato, una vía de reacción irreversible, aumentando de este modo significativamente la tasa de conversión a psicosa.

Las enzimas termorresistentes pueden prevenir comercialmente los microorganismos y reaccionar fácilmente con sustratos de alta concentración, por lo que sus efectos son prominentes. Además, el procedimiento de producción de la presente solicitud puede simplificar o eliminar el proceso de separación y purificación, incluyendo la alta
 5 concentración del producto de reacción (es decir, psicosa) por medio del aumento en la tasa de conversión de psicosa y, por lo tanto, existe una ventaja económica, permitiendo al mismo tiempo un procedimiento de producción simple. En particular, la separación mediante SMB se puede minimizar o eliminar, maximizando así la eficiencia y el rendimiento de la separación.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

A continuación, se describirá en detalle la presente solicitud. Mientras tanto, la descripción de un aspecto y realización divulgados en la presente solicitud también se puede aplicar a otros aspectos y realizaciones con respecto a elementos comunes.
 15 Además, todas las combinaciones de varios elementos descritos en la presente solicitud caen dentro del alcance de la presente solicitud. Además, no parece que el alcance de la presente solicitud esté limitado por la siguiente descripción detallada.

Con el fin de lograr los objetos anteriores, un aspecto de la presente solicitud proporciona una psicosa-6-fosfato fosfatasa.

20

Específicamente, la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud puede ser una psicosa-6-fosfato fosfatasa derivada del género *Alicyclobacillus*, *Amycolatopsis*, *Anaerolinea*, *Archaeoglobus*, *Bacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldilinea*, *Caldithrix*, *Carboxydocella*, *Carboxydotherrmus*, *Chloroflexi*, *Defluviitoga*, *Deinococcus*, *Desulfurococcus*, *Dictyoglomus*, *Effusibacillus*, *Fervidobacterium*, *Geobacillus*,
 25 *Halococcus*, *Hydrogenivirga*, *Hydrogenobacter*, *Hyperthermus*, *Kosmotoga*, *Marinitoga*, *Meiothermus*, *Mesotoga*, *Metallosphaera*, *Methanocella*, *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanolobus*, *Methanosarcina*, *Methanothermus*, *Petrotoga*, *Picrophilus*, *Pseudonocardia*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium*, *Rhodothermus*, *Slackia*, *Staphylothermus*, *Sulfolobus*, *Thermanaerotherm*, *Thermoanaerobacter*,
 30 *Thermoanaerobacterium*, *Thermobifida*, *Thermococcus*, *Thermocrinis*, *Thermoflexus*, *Thermotoga*, *Thermus* y *Truepera*, y más específicamente derivada de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus tengchongensis*, *Amycolatopsis thermoflava*, *Anaerolinea thermolimosa*, *Anaerolinea thermophila*, *Archaeoglobus fugidus*, *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*, *Bacillus licheniformis*, *Caldicellulosiruptor bescii*,
 35 *Caldilinea aerophila*, *Caldithrix abyssi*, *Carboxydocella* sp. ULO1, *Carboxydotherrmus*

ferrireducens, *Chloroflexi bacterium* 54-19, *Defluviitoga tunisiensis*, *Deinococcus aerius*,
Deinococcus apachensis, *Deinococcus aquatilis*, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus*
hopiensis, *Deinococcus maricopensis*, *Deinococcus murrayi*, *Deinococcus reticulitermitis*,
Deinococcus wulumuqiensis, *Deinococcus* sp. Leaf326, *Deinococcus phoenicis*,
5 *Deinococcus proteolyticus*, *Deinococcus* sp. 17bor-2, *Deinococcus* sp. NW-56,
Deinococcus sp. RL, *Deinococcus* sp. YIM 77859, *Desulfurococcus mucosus*,
Dictyoglomus turgidum, *Effusibacillus pohliae*, *Fervidobacterium gondwanense*,
Fervidobacterium islandicum, *Fervidobacterium nodosum*, *Fervidobacterium pennivorans*,
Geobacillus sp., *Geobacillus stearothermophilus*, *Halococcus salifodinae*, *Hydrogenivirga*
10 *sp.* 128-5-R1-1, *Hydrogenobacter hydrogenophilus*, *Hydrogenobacter thermophilus*,
Hyperthermus butylicus, *Kosmotoga arenicorallina*, *Kosmotoga olearia*, *Marinitoga*
piezophila, *Meiothermus cerbereus*, *Meiothermus chliarophilus*, *Meiothermus ruber*,
Meiothermus Silvanus, *Meiothermus taiwanensis*, *Meiothermus timidus*, *Meiothermus*
rufus, *Mesotoga infera*, *Metallosphaera sedula*, *Methanocella conradii*, *Methanococcoides*
15 *methylutens*, *Methanohalobium evestigatum*, *Methanobolus tindarius*, *Methanosarcina*
sicilia, *Methanothermobacter feravidus*, *Petrotoga mobilis*, *Picrophilus torridus*, *Pseudonocardia*
thermophila, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrodicticum occultum*, *Rhodothermus marinus*, *Slackia*
heliotrinireducens, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermanaerotherm*
daxensis, *Thermoanaerobacter* sp., *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*,
20 *Thermoanaerobacter wiegelii*, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Thermobifida*
halotolerans, *Thermococcus celer*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus profundus*,
Thermocrinis minervae, *Thermocrinis ruber*, *Thermoflexus hugenholtzii*, *Thermotoga*
lettingae, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga petrophilia*, *Thermus amyloliquefaciens*,
Thermus filiformis, *Thermus thermophilus* o *Truepera radiovictrix*, pero no se limita a los
25 mismos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la "psicosa-6-fosfato" se conoce
 como alulosa-6-fosfato, y la "psicosa-6-fosfato fosfatasa" es una enzima que cataliza la
 producción de psicosa mediante la desfosforilación del grupo fosfato de la psicosa-6-
 fosfato.

30 La psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud puede usarse para producir
 psicosa con alta eficiencia en combinación con enzimas procesadoras de almidón y
 enzimas convertidoras de fosfato de azúcar, en la preparación de psicosa mediante la
 descomposición de almidón de alta concentración.

La psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud puede tener una secuencia
 35 de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 222, o puede incluir una

secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos.

Además, puede tener una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 6, 9, 12, 26, 29, 38 a 43, 45 a 53, 56, 57, 59, 60, 64 a 66, 69, 70, 72, 76, 80, 81, 91 a 93, 95, 99 a 103, 113, 114, 116, 117, 131, 134, 136, 142, 145, 146, 148, 164, 167, 169, 172, 177, 184 a 187, 189, 191, 192, 211, 217, y 221, o puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos.

Más específicamente, puede tener una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 29, 53, 56, 60, 70, 76, 80, 81, 116, 117, 131, 134, 145, 167, 185, 186 y 191, o puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos un 70% con la secuencia de aminoácidos, pero no se limita a ello.

Además, se puede incluir sin limitación cualquier secuencia que tenga la misma actividad que la secuencia de aminoácidos. Además, puede incluir una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 222 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80% de homología o identidad con la misma, pero no se limita a ello. Específicamente, el aminoácido puede incluir un aminoácido que tenga al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología o identidad con el mismo. Además, es evidente que cualquier proteína que tenga una secuencia de aminoácidos, en la que parte de la secuencia de aminoácidos esté delecionada, modificada, sustituida o añadida, también puede caer dentro del alcance de la presente solicitud siempre que incluya una secuencia de aminoácidos que tenga tal homología o identidad y que exhiba un efecto correspondiente al de la proteína antedicha.

Es decir, en la presente solicitud, aunque se describe como "una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de una SEQ ID NO particular", es evidente que cualquier proteína, en la que parte de la secuencia de aminoácidos esté delecionada, modificada, sustituida, conservadoramente sustituida, o añadida, también se puede usar en la presente solicitud siempre que la proteína tenga la misma o correspondiente actividad a la proteína compuesta por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO correspondiente. Por ejemplo, siempre que una proteína tenga una actividad idéntica o correspondiente a la de la enzima, la adición de una secuencia que no altera la función de la proteína en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de aminoácidos, mutaciones que ocurren naturalmente, mutaciones silenciosas o sus sustituciones conservadoras no quedan excluidas. Es evidente que, aunque la proteína tiene tal adición o mutación de secuencia, cae dentro del alcance de la presente solicitud.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "homología" o "identidad" se refiere a un grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos dadas, y puede expresarse como un porcentaje.

Los términos homología e identidad a menudo se pueden usar indistintamente
5 entre sí.

La homología de secuencia o identidad del polinucleótido o polipéptido conservado puede determinarse usando algoritmos de alineación estándar, y puede usarse con penalizaciones por espacios por defecto establecidas por el programa utilizado. Sustancialmente, secuencias homólogas o idénticas pueden hibridar en condiciones
10 moderadas o de alta rigurosidad de modo que la longitud completa de la secuencia o al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más de la longitud completa pueda hibridar. También se consideran los polinucleótidos que contienen codones degenerados en lugar de codones en polinucleótidos que hibridan.

Si cualquiera de dos secuencias polinucleotídicas tiene homología, similitud o
15 identidad puede determinarse, por ejemplo, mediante un algoritmo informático conocido como el programa "FASTA" (Pearson et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444) utilizando los parámetros predeterminados. Alternativamente, se puede determinar mediante el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453), que se realiza utilizando el programa Needleman del paquete EMBOSS
20 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16:276-277) (preferentemente, versión 5.0.0 o versiones posteriores) (paquete de programa GCG (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, SF et al., *J MOLEC BIOL* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994; y CARILLO et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073) Por ejemplo, la homología, similitud o identidad
25 se puede determinar usando BLAST o ClustalW del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La homología, similitud o identidad de polinucleótidos o polipéptidos se puede determinar comparando la información de la secuencia usando, por ejemplo, el programa
30 informático GAP, tal como Needleman et al. (1970), *J. Mol Biol.* 48:443 como se divulga en Smith y Waterman, *Adv. Apl. Math* (1981) 2:482. En resumen, el programa GAP define la homología, similitud o identidad como el valor obtenido al dividir el número de símbolos alineados de manera similar (es decir, nucleótidos o aminoácidos) por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros predeterminados para el
35 programa GAP pueden incluir (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un

valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745, como se divulga en Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979) (o la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4)); (2) una penalización de 3.0 por cada espacio y una penalización adicional de 0.10 por cada símbolo en cada espacio (o una penalización de apertura de espacio de 10 y una penalización de extensión de espacio de 0.5); y (3) ninguna penalización por espacios en los extremos. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "homología" o "identidad" representa la relación entre secuencias.

La psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud puede ser una enzima que cataliza selectivamente la desfosforilación de psicosa-6-fosfato. Específicamente, la psicosa-6-fosfato fosfatasa puede ser una enzima que cataliza la desfosforilación de psicosa-6-fosfato cuando se mezcla con glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato. Por ejemplo, cuando la psicosa-6-fosfato fosfatasa se mezcla con la misma cantidad de psicosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, la tasa de desfosforilación de psicosa-6-fosfato es 1% o más, 10% o más, o 30% o más. Debido a la actividad selectiva de la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud, se puede exhibir una alta tasa de conversión de psicosa en una conversión enzimática de un solo recipiente usando una pluralidad de enzimas y sustratos al mismo tiempo.

La psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud se puede producir transformando una cepa con la propia enzima o ADN que expresa la enzima, cultivando la cepa transformada para obtener un cultivo, e interrumpir el cultivo, seguido de purificación mediante cromatografía en columna. La cepa para la transformación puede ser *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* o *Bacillus subtilis*, pero no se limita a las mismas, y puede tener potencial para transformarse en cepas GRAS (generalmente reconocidas como seguras) posteriormente.

Otro aspecto de la presente solicitud proporciona un ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa, o un vector que incluye el ácido nucleico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "ácido nucleico" tiene un significado que incluye colectivamente moléculas de ADN o ARN. Los nucleótidos, que son las unidades estructurales básicas de los ácidos nucleicos, incluyen no solo nucleótidos naturales sino también análogos modificados de los mismos en los que se modifican los sitios de azúcar o bases (véase Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley,

Nueva York (1980); Uhlman y Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543–584 (1990)).

El ácido nucleico que codifica la enzima de la presente solicitud puede ser una secuencia de ADN o ARN en la que los nucleótidos como una unidad están unidos covalentemente, y específicamente, puede ser cualquier secuencia de nucleótidos entre
5 todos los números posibles en el momento de la conversión del ADN de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 222 (modificación de aminoácidos en 61 codones), y más específicamente puede incluir un ácido nucleico capaz de ser traducido para exhibir una actividad enzimática deseada mientras tiene al menos 90% o más, 95% o más, 97% o más, 99% o más, o 100% de homología, similitud o identidad con cada nucleótido que
10 puede traducirse en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 222 de la presente solicitud. Es evidente que proteínas que tienen la misma actividad debido a la degeneración de codones, proteínas que tienen las mismas secuencias de aminoácidos después de ser transcritas, específicamente, proteínas que consisten en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 222, o
15 polinucleótidos que pueden traducirse en proteínas que tienen homología, similitud o identidad con las mismas también están dentro del alcance de la presente solicitud. Más específicamente, la secuencia de ácido nucleico de la presente solicitud no se muestra por separado y puede estar compuesta por todo el número de codones de ADN que pueden traducirse en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 222, pero no
20 se limita a las mismas.

Además, una sonda que puede ser preparada a partir de una secuencia de genes conocida, por ejemplo, cualquier secuencia que pueda hibridar con una secuencia complementaria a toda o parte de la secuencia de nucleótidos en condiciones de rigurosidad para codificar la enzima de la presente solicitud, puede incluirse sin limitación.

25 Las "condiciones de rigurosidad" se refieren a las condiciones en las que se permite la hibridación específica entre polinucleótidos. Tales condiciones se describen específicamente en la literatura (consulte J. Sambrook et al., *supra* 9.50-9.51, 11.7-11.8). Por ejemplo, las condiciones de rigurosidad pueden incluir condiciones bajo las cuales los genes que tienen una alta homología o identidad de 80% o más, 85% o más, específicamente 90% o más, más específicamente 95% o más, mucho más
30 específicamente 97% o más, aún mucho más específicamente 99% o más se hibridan entre sí, y los genes que tienen una homología o identidad más baja que las homologías o identidades anteriores no se hibridan entre sí, o condiciones de lavado de hibridación Southern, es decir, lavar una vez, específicamente dos veces o tres veces a una
35 concentración de sal y una temperatura correspondiente a 60 °C, 1 × SSC, 0.1% SDS,

específicamente 60 °C, 0.1 × SSC, 0.1% SDS, y más específicamente 68 °C, 0.1 × SSC, 0.1% SDS.

La hibridación requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque son posibles desajustes erróneos entre bases dependiendo de la rigurosidad de la hibridación. El término "complementario" se usa para describir la relación entre bases de nucleótidos que pueden hibridar entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina. Por lo tanto, la presente solicitud puede incluir fragmentos de nucleótidos aislados complementarios a la secuencia completa, así como secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente similares a las mismas.

Específicamente, los polinucleótidos que tienen una homología o identidad pueden detectarse usando las condiciones de hibridación que incluyen una etapa de hibridación a un valor de T_m de 55 °C en las condiciones descritas anteriormente. Además, el valor de T_m puede ser 60 °C, 63 °C o 65 °C, pero no se limita a ello, y los expertos en la técnica pueden ajustarlo de manera apropiada dependiendo del propósito del mismo.

La rigurosidad apropiada para hibridar polinucleótidos depende de la longitud de los polinucleótidos y del grado de complementación, y estas variables son bien conocidas en la técnica (consulte Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "vector" puede referirse a un constructo de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica la enzima de la presente solicitud, que está operativamente enlazada a una secuencia reguladora adecuada de manera que la proteína diana modificada se puede expresar en un huésped apropiado. La secuencia reguladora puede incluir un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier secuencia operadora para regular la transcripción, una secuencia que codifique un dominio de unión al ribosoma de ARNm apropiado y una secuencia que regule la terminación de la transcripción y traducción. Después de transformarse en una célula huésped adecuada, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del huésped, y puede integrarse en el genoma del huésped mismo.

El vector usado en la presente solicitud no está particularmente limitado siempre que sea capaz de replicarse en la célula huésped, y puede usarse cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos del vector usado convencionalmente pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, como vector fago o vector cósmido, se puede usar pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, etc. y como vector plasmídico, se pueden utilizar aquellos

basados en pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, etc. Específicamente, pueden usarse los vectores pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 y pCC1BAC.

Otro aspecto adicional de la presente solicitud proporciona un transformante que incluye un vector que incluye un ácido nucleico que codifica la enzima de la presente solicitud.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el "transformante que incluye el ácido nucleico que codifica la enzima" o "transformante que incluye el vector que incluye el ácido nucleico que codifica la enzima" puede referirse a un microorganismo que se ha recombinado de modo que se expresa la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud. Por ejemplo, dicho término puede referirse a una célula huésped o un microorganismo que contiene un ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa, o que se transforma con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa de modo que se expresa la psicosa-6-fosfato fosfatasa. Para el propósito de la presente solicitud, la psicosa-6-fosfato fosfatasa expresada por el transformante puede estar compuesta por cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 222, pero no se limita a las mismas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "transformación" se refiere a la introducción de un vector que incluye un ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa en una célula huésped de modo que la proteína codificada por el ácido nucleico se pueda expresar en la célula huésped. Siempre que el ácido nucleico transformado pueda expresarse en una célula huésped, no importa si está integrado en el cromosoma de la célula huésped y ubicado en el mismo o ubicado extracromosómicamente, y ambos casos pueden incluirse. Además, el ácido nucleico puede incluir ADN y ARN que codifica el ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud. El ácido nucleico puede introducirse en cualquier forma, siempre que pueda introducirse en la célula huésped y expresarse en la misma. Por ejemplo, el ácido nucleico puede introducirse en la célula huésped en forma de un casete de expresión, que es un constructo génico que incluye todos los elementos necesarios para su expresión autónoma. El casete de expresión puede incluir comúnmente un promotor unido operativamente al ácido nucleico, un terminador de la transcripción, un dominio de unión a ribosoma o un terminador de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión autorreplicable. Además, el ácido nucleico puede introducirse en la célula huésped tal como está y unirse operativamente a las secuencias requeridas para la expresión en la célula huésped, pero no se limita a ello.

Además, como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "operativamente unido" significa que la secuencia del gen está funcionalmente unida a una secuencia promotora que inicia y media la transcripción del ácido nucleico que codifica la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud.

5 La inserción del ácido nucleico o del vector en el cromosoma puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante recombinación homóloga, pero el procedimiento no se limita a ello. Además, el vector puede incluir además un marcador de selección para confirmar la inserción en el cromosoma. El marcador de selección sirve para seleccionar las células transformadas
10 con el vector, es decir, para confirmar si se ha insertado la molécula de ácido nucleico diana y los marcadores que proporcionan fenotipos seleccionables, como resistencia a fármacos, auxotrofia, resistencia a agentes tóxicos para las células o se puede utilizar la expresión de proteínas modificadas en la superficie. Cuando se trata con un agente selectivo, solo las células que expresan el marcador de selección pueden sobrevivir o
15 expresar otros rasgos fenotípicos y, por lo tanto, las células transformadas pueden ser seleccionadas.

El procedimiento para transformar el vector de la presente solicitud incluye cualquier procedimiento para introducir un ácido nucleico en una célula y puede realizarse seleccionando una técnica estándar adecuada conocida en la técnica, dependiendo de la
20 célula huésped. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir electroporación, precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2), infección retroviral, microinyección, un procedimiento de polietilenglicol (PEG), un procedimiento de DEAE-dextrano, un procedimiento de liposomas catiónicos y un procedimiento acetato de litio-DMSO, pero no se limita a los mismos.

25 Como célula huésped, es preferible utilizar un huésped que tenga una alta eficacia para introducir ADN y una alta eficacia para expresar el ADN introducido. Por ejemplo, puede ser un microorganismo del género *Corynebacterium*, un microorganismo del género *Escherichia*, un microorganismo del género *Serratia*, un microorganismo del género *Bacillus*, un microorganismo del género *Saccharomyces* o un microorganismo del
30 género *Pichia*, y específicamente, puede ser *E. coli*, pero no se limita a ello, y puede aplicarse a todas las cepas GRAS.

Más específicamente, el transformante de la presente solicitud puede ser 222 en total, desde *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap1 hasta *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap222.

Otro aspecto adicional de la presente solicitud proporciona una composición para
35 la producción de psicosa que incluye la psicosa-6-fosfato fosfatasa, un microorganismo

que expresa la misma o un cultivo del microorganismo. Específicamente, la composición puede incluir además un fosfato de azúcar y, más específicamente, puede incluir además psicosa-6-fosfato como sustrato, pero no se limita a ello.

La composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede producir psicosa a través de la desfosforilación de psicosa-6-fosfato al incluir la psicosa-6-fosfato fosfatasa que actúa para producir psicosa mediante la desfosforilación de psicosa-6-fosfato, un microorganismo que expresa la misma o un cultivo del microorganismo.

Además, la composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede incluir además una enzima y/o un sustrato implicado en la vía de producción de psicosa de la presente solicitud [(i) almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos; (ii) un fosfato o polifosfato u otros compuestos fosforilantes; (iii) una fructosa-6-fosfato-3-epimerasa; (iv) una glucosa-6-fosfato-isomerasa; (v) una fosfoglucomutasa o una glucoquinasa; y/o (vi) una α -glucano fosforilasa, una almidón fosforilasa, una maltodextrina fosforilasa, una sacarosa fosforilasa, una α -amilasa, una pululanasa, una isoamilasa, una glucoamilasa, una α -glucanotransferasa, una polifosfato glucoquinasa o una sacarasa]; un microorganismo que expresa las enzimas involucradas en la vía de producción de psicosa; o un cultivo del microorganismo que expresa las enzimas involucradas en la vía de producción de psicosa. Sin embargo, las enzimas que se incluyen en la composición para la producción de psicosa de la presente solicitud y los sustratos usados en la producción de psicosa son meramente ilustrativos y no están limitados siempre que se pueda producir psicosa usando la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud.

Específicamente, la fructosa-6-fosfato-3-epimerasa puede incluir cualquier proteína que sea activa en la conversión de fructosa-6-fosfato en psicosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato-isomerasa puede incluir cualquier proteína que sea activa en la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. La fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) puede incluir cualquier proteína que sea activa en la conversión de glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato. La fosforilasa de almidón/maltodextrina (EC 2.4.1.1) y la fosforilasa de α -glucano pueden incluir cualquier proteína que sea activa en la transferencia de fosforilo a glucosa para producir glucosa-1-fosfato a partir de almidón o maltodextrina. La sacarosa fosforilasa (EC 2.4.1.7) puede incluir cualquier proteína que sea activa en la transferencia de fosforilo a glucosa para producir glucosa-1-fosfato a partir de sacarosa. La α -amilasa (EC 3.2.1.1), pululanasa (EC 3.2.1.41), isoamilasa (EC 3.2.1.68), 4- α -glucanotransferasa (EC 2.4.1.25) y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), que son las enzimas de licuefacción de almidón pueden incluir cualquier proteína que sea activa en la conversión de almidón o

maltodextrina en maltooligosacárido desramificado o glucosa. La sacarasa (EC 3.2.1.26) puede incluir cualquier proteína que sea activa en la conversión de sacarosa en glucosa. La polifosfato glucoquinasa (EC 2.7.1.63) puede incluir cualquier proteína que sea activa en la transferencia de fosforilo a glucosa para convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato.

5 La psicosa-6-fosfato fosfatasa, α -glucano fosforilasa, fosfoglucomutasa (o fosfomanomutasa), glucosa-6-fosfato isomerasa, psicosa-6-fosfato-3-epimerasa (o ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa), pululanasa (o isoamilasa), 4- α -glucanotransferasa y polifosfato glucoquinasa que se incluyen en la composición para la producción de psicosa de la presente solicitud pueden tener pocas o ninguna reacción secundaria con psicosa,
10 que es el producto final.

 La composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede contener adecuadamente no solo la psicosa-6-fosfato fosfatasa, sino también una pluralidad de enzimas y sustratos de las mismas para preparar psicosa. La psicosa-6-fosfato fosfatasa tiene el efecto de poder producir selectiva e irreversiblemente psicosa a
15 partir de psicosa-6-fosfato incluso en un entorno en el que están presentes varias enzimas.

 La composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede incluir además cualquier excipiente adecuado usado convencionalmente. Los ejemplos de tales excipientes incluyen, por ejemplo, conservadores, agentes humectantes,
20 dispersantes, agentes de suspensión, tampones, estabilizadores y agentes isotónicos, pero no se limitan a los mismos.

 La composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede incluir además un ión metálico o una sal metálica. En una realización, el ión metálico puede ser un catión metálico divalente. Específicamente, el ión metálico puede ser al
25 menos uno seleccionado del grupo que consiste en iones Ni, Mg, Co, Mn, Fe y Zn. Más específicamente, la composición para la producción de psicosa de la presente solicitud puede incluir además una sal metálica. Incluso más específicamente, la sal metálica puede ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en NiSO₄, MgSO₄, MgCl₂, NiCl₂, CoSO₄, CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, FeSO₄ y ZnSO₄.

30 Incluso otro aspecto de la presente solicitud proporciona un procedimiento para la producción de psicosa, que incluye convertir psicosa-6-fosfato en psicosa poniendo en contacto la psicosa-6-fosfato con la psicosa-6-fosfato fosfatasa, un microorganismo que expresa la misma o un cultivo del microorganismo.

 Específicamente, en el procedimiento para la producción de psicosa, la psicosa
35 puede producirse poniendo psicosa-6-fosfato en contacto con la psicosa-6-fosfato

fosfatasa, un microorganismo que expresa la misma o un cultivo del microorganismo, pero no se limita a ello.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir fructosa-6-fosfato en psicosa-6-fosfato poniendo fructosa-6-fosfato en contacto con fructosa-6-fosfato-3-epimerasa, un microorganismo que expresa la fructosa-6-fosfato-3-epimerasa, o un cultivo del microorganismo que expresa la fructosa-6-fosfato-3-epimerasa, antes de la etapa de convertir psicosa-6-fosfato en psicosa.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato poniendo glucosa-6-fosfato en contacto con glucosa-6-fosfato-isomerasa, un microorganismo que expresa la glucosa-6-fosfato-isomerasa, o un cultivo del microorganismo que expresa la glucosa-6-fosfato-isomerasa, antes de la etapa de convertir fructosa-6-fosfato en psicosa-6-fosfato.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato poniendo glucosa-1-fosfato en contacto con fosfoglucomutasa, un microorganismo que expresa la fosfoglucomutasa, o un cultivo del microorganismo que expresa la fosfoglucomutasa, antes de la etapa de convertir glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir glucosa en glucosa-6-fosfato poniendo glucosa en contacto con polifosfato glucoquinasa, un microorganismo que expresa la polifosfato glucoquinasa, o un cultivo del microorganismo que expresa la polifosfato glucoquinasa y polifosfato, antes de la etapa de convertir glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos en glucosa-1-fosfato poniendo almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos en contacto con α -glucano fosforilasa, almidón fosforilasa, maltodextrina. fosforilasa o sacarosa fosforilasa; un microorganismo que expresa la fosforilasa; o un cultivo del microorganismo que expresa la fosforilasa y el fosfato, antes de la etapa de convertir glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además convertir almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos en glucosa poniendo almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos en contacto con α -amilasa, pululanasa, isoamilasa, glucoamilasa o sacarasa; un microorganismo que expresa la α -amilasa, pululanasa, glucoamilasa, sacarasa o isoamilasa; o un cultivo del microorganismo que expresa la α -amilasa, pululanasa, glucoamilasa, sacarasa o

isoamilasa, antes de la conversión de almidón, maltodextrina, sacarosa o una combinación de los mismos en glucosa-1-fosfato.

La psicosa-6-fosfato fosfatasa, α -glucano fosforilasa, fosfoglucomutasa (o fosfomanomutasa), glucosa-6-fosfato isomerasa, psicosa-6-fosfato-3-epimerasa (o
5 ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa), pululanasa (o isoamilasa), 4- α -glucanotransferasa y polifosfato glucoquinasa que se utilizan en el procedimiento para la producción de psicosa de la presente solicitud pueden tener pocas o ninguna reacción secundaria con psicosa, que es el producto final.

En el procedimiento para la producción de psicosa de la presente solicitud, la
10 psicosa óptima/máxima se puede producir en una combinación compleja con enzimas de conversión de fosfato de azúcar mediante la descomposición de una alta concentración de almidón, y se puede usar un máximo de 8 tipos de enzimas en combinación para asegurar la máxima productividad de psicosa.

Primero, la glucano fosforilasa (glicógeno fosforilasa, EC 2.4.1.1), una enzima que
15 degrada el almidón y produce glucosa-1-fosfato, produce específicamente glucosa-1-fosfato en almidón unido a α -1,4. En segundo lugar, la fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) o fosfomanomutasa (EC 5.4.2.8), que convierte la glucosa-1-fosfato así producida en glucosa-6-fosfato, se usa en la reacción enzimática del complejo intermedio. Como tercera enzima utilizada, se utiliza glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9), que convierte
20 la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. En cuarto lugar, la ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa o psicosa-6-fosfato-3-epimerasa, que es la enzima que convierte la fructosa-6-fosfato en psicosa-6-fosfato como se describió anteriormente, se usa para producir psicosa-6-fosfato en reacción reversible. En la reacción del almidón a psicosa-6-fosfato, aunque es imposible producir más de una cierta cantidad en la reacción reversible, el uso
25 de la psicosa-6-fosfato fosfatasa selectiva incluida en la presente invención permite la producción de psicosa en alto rendimiento.

Con el fin de aumentar aún más la tasa de utilización del almidón, se usa pululanasa (EC 3.2.1.41) o isoamilasa (EC 3.2.1.68) en conjunto para degradar los
30 enlaces α -1,6 ramificados además de los enlaces α -1,4 de la amilopectina. Además, para aumentar la utilización de almidón de glucano fosforilasa, se usa 4- α -glucanotransferasa (EC 2.4.1.25). La utilización del sustrato de almidón segmentado puede aumentarse uniendo oligosacáridos en forma de enlaces α -1,4 a maltosa u otros oligosacáridos, que son sustratos con actividad relativamente baja. Además, la polifosfato-glucosa fosfotransferasa (EC 2.7.1.63) puede usarse para producir psicosa adicional a través de
35 reacciones enzimáticas complejas a partir de la glucosa degradada después del uso de

almidón, asegurando así la máxima tasa de conversión de psicosa.

Además, en el procedimiento de la presente solicitud, el contacto se puede llevar a cabo a un pH de 5.0 a 9.0, específicamente a un pH de 6.0 a 8.0.

En el procedimiento de la presente solicitud, el contacto se puede llevar a cabo a una temperatura de 40 °C a 80 °C, específicamente a una temperatura de 40 °C a 60 °C o de 50 °C a 60 °C.

En el procedimiento de la presente solicitud, el contacto se puede llevar a cabo durante 2 horas a 24 horas, específicamente durante 6 a 24 horas o 120 horas.

En el procedimiento de la presente solicitud, el contacto se puede llevar a cabo a un pH de 5.0 a 9.0, a una temperatura de 40 °C a 80 °C y/o durante 2 horas a 24 horas. Específicamente, el contacto se puede llevar a cabo a un pH de 6.0 a 8.0, a una temperatura de 40 °C a 60 °C o de 50 °C a 60 °C, y/o durante 6 horas a 24 horas o 120 horas.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además la purificación de psicosa. No existe ninguna limitación particular sobre el procedimiento para purificar psicosa, y puede usarse cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales procedimientos de purificación incluyen cromatografía, cristalización fraccionada y purificación de iones, que se pueden llevar a cabo solos o en una combinación de dos o más de los mismos. Por ejemplo, el producto de reacción de psicosa puede purificarse mediante cromatografía. En este caso, la purificación de sacáridos por cromatografía se puede realizar basándose en pequeñas diferencias en la fuerza de unión entre los sacáridos a purificar y los iones metálicos unidos a una resina iónica.

El procedimiento de la presente solicitud puede incluir además blanquear, desmineralizar o ambos antes o después de la etapa de purificación. El blanqueamiento y/o desmineralización permite la producción de psicosa más pura y sin impurezas.

Modo para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente solicitud se describirá con más detalle mediante ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos únicamente se proporcionan con fines ilustrativos para ayudar en la comprensión de la presente solicitud, y no se pretende que el alcance de la presente solicitud se limite a estos Ejemplos o por ellos.

En la presente solicitud, los aminoácidos se pueden representar mediante las siguientes abreviaturas o nombres de aminoácidos.

Tabla 1

Tipo de aminoácido	Abreviatura	Codón de ADN codificado por el aminoácido correspondiente	Codón de ARN codificado por el aminoácido correspondiente
alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG	GCU, GCC, GCA, GCG
arginina	R	AGA, AGG	AGA, AGG
asparagina	N	AAT, AAC	AAU, AAC
ácido aspártico	D	GAT, GAC	GAU, GAC
cisteína	C	TGT, TGC	UGU, UGC
ácido glutámico	E	GAA, GAG	GAA, GAG
glutamina	Q	CAA, CAG	CAA, CAG
glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG	GGU, GGC, GGA, GGG
histidina	H	CAC, CAT	CAC, CAU
isoleucina	I	ATT, ATC, ATA	AUU, AUC, AUA
leucina	L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
lisina	K	AAA, AAG	AAA, AAG
metionina	M	ATG	AUG
fenilalanina	F	TTT, TTC	UUU, UUC
prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG	CCU, CCC, CCA, CCG
serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG	UCU, UCC, UCA, UCG
treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG	ACU, ACC, ACA, ACG
triptófano	W	TGG	UGG
tirosina	Y	TAT, TAC	UAU, UAC
valina	V	GTT, GTC, GTA, GTG	GUU, GUC, GUA, GUG

5 Ejemplo 1: Preparación del vector de expresión recombinante de cada enzima y microorganismo transformados

Con el fin de proporcionar las enzimas necesarias para la vía de producción de psicosa, se seleccionaron genes termorresistentes, que se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

SEQ ID NO	Especie y Género	NCBI No.
1	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59297.1
2	<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>	KRW92667.1
3		WP_058093972.1
4	<i>Amycolatopsis thermoflava</i>	WP_017986193.1
5		WP_037323890.1
6	<i>Anaerolinea thermolimosa</i>	WP_084001059.1
7		WP_062189018.1
8		GAP08215.1
9	<i>Anaerolinea thermophila</i>	BAJ62794.1
10		KUK46216.1
11		BAJ63987.1
12	<i>Archaeoglobus fujidus</i>	AAB91288.1
13		AAB89113.1
14		AAB89416.1
15	<i>Archaeoglobus profundus</i>	WP_012940213.1
16	<i>Archaeoglobus veneficus</i>	WP_013683862.1
17	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41557.1
18		AAU39603.1
19		AAU43073.1
20	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	ACM59531.1
21		ACM59457.1
22		ACM61198.1
23		ACM61211.1
24		ACM60182.1
25	<i>Caldilinea aerophila</i>	BAL98676.1
26		BAM00874.1
27		WP_014433277.1
28	<i>Caldithrix abyssi</i>	APF18124.1
29		APF18744.1
30		APF16831.1
31		WP_006929206.1

32	<i>Carboxydocella</i> sp. UL01	WP_079933669.1
33	<i>Carboxydotherrnus ferrireducens</i>	WP_028051691.1
34		WP_028051711.1
35		WP_028053062.1
36	<i>Chloroflexi bacterium</i> 54-19	OJW02856.1
37	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	WP_045087739.1
38	<i>Deinococcus aerius</i>	WP_103127908.1
39	<i>Deinococcus spachensis</i>	WP_019584763.1
40	<i>Deinococcus aquatilis</i>	WP_019011981.1
41	<i>Deinococcus geothermalis</i>	WP_011529832.1
42	<i>Deinococcus hopiensis</i>	WP_084049191.1
43	<i>Deinococcus maricopensis</i>	WP_013556873.1
44	<i>Deinococcus murrayi</i>	WP_084542862.1
45		WP_051363537.1
46	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>	WP_092263046.1
47	<i>Deinococcus wulumuqiensis</i>	WP_017870657.1
48	<i>Deinococcus</i> sp. Leaf326	WP_056297006.1
49	<i>Deinococcus phoenixis</i>	WP_034353069.1
50	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	WP_013614672.1
51	<i>Deinococcus</i> sp. 17bor-2	WP_109826642.1
52	<i>Deinococcus</i> sp. NW-56	WP_104990527.1
53	<i>Deinococcus</i> sp. RL	KEF35131.1
54		WP_081851636.1
55	<i>Deinococcus</i> sp. YIM 77859	WP_034384462.1
56	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	ADV64381.1
57		ADV64382.1
58		ADV64566.1
59	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	YP_002352793.1
60		YP_002353123.1
61		YP_002352154.1
62	<i>Effusibacillus pohliae</i>	WP_018132070.1
63	<i>Fervidobacterium gondwanense</i>	WP_072759218.1
64	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	AMW32328.1
65		AMW33413.1

66	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	ABS60322.1
67		ABS61294.1
68	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	AFG34634.1
69		AFG35917.1
70		WP_064011782.1
71	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_011232549.1
72	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ALA69320.1
73		ALA71677.1
74		ALA71036.1
75		ALA70927.1
76		ALA69332.1
77	<i>Halococcus salifodinae</i>	WP_005045395.1
78		EMA49396.1
79		EMA52756.1
80	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	WP_008285887.1
81	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	WP_096602199.1
82		WP_096601840.1
83	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	WP_012963417.1
84	<i>Hyperthermus butylicus</i>	ARM80367.1
85	<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	WP_084251417.1
86	<i>Kosmotoga olearia</i>	ACR80305.1
87		ACR80819.1
88	<i>Marinitoga piezophila</i>	AEX84499.1
89		AEX85453.1
90		AEX85799.1
91	<i>Neiothermus cerbereus</i>	WP_027877060.1
92		WP_027878515.1
93	<i>Neiothermus chliarophilus</i>	WP_027892542.1
94		WP_051304156.1
95	<i>Neiothermus ruber</i>	ADD26908.1
96		WP_013013826.1
97		WP_013013825.1
98		WP_013012548.1
99		WP_027883570.1
100	<i>Neiothermus silvanus</i>	ADH63424.1
101		WP_013157023.1
102	<i>Neiothermus taiwanensis</i>	WP_027888084.1
103		WP_027888305.1

104	<i>Neiothermus timidus</i>	WP_018466213.1
105		WP_018465080.1
106		WP_018467688.1
107		WP_018467518.1
108		WP_018465603.1
109		WP_018466116.1
110		WP_018467797.1
111		WP_018467420.1
112		WP_018466214.1
113		WP_018465420.1
114	<i>Neiothermus rufus</i>	WP_036271046.1
115	<i>Nesotoga infera</i>	EUI90417.1
116	<i>Netallosphaera sedula</i>	ABP94905.1
117	<i>Nethanocella conradii</i>	AFC99407.1
118		WP_014405429.1
119		AFD00405.1
120	<i>Nethanococcoides methylutens</i>	WP_048194361.1
121		AKB84306.1
122	<i>Nethanohalobium evestigatum</i>	ADI75005.1
123		WP_013193898.1
124	<i>Nethanolobus tindarius</i>	WP_048135864.1
125		WP_048135649.1
126		ETA67773.1
127	<i>Nethanosarcina siciliae</i>	WP_048179383.1
128		AKB37722.1
129		AKB35909.1
130	<i>Nethanothermus fervidus</i>	ADP76907.1
131	<i>Petrotoga mobilis</i>	ABX30802.1
132		EUI15285.1
133	<i>Picrophilus torridus</i>	AAT44010.1
134		AAT43693.1
135	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	WP_073456926.1

136	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AAL80556.1
137		AAL81109.1
138		WP_014835302.1
139		AAL82045.1
140		AAL82122.1
141		AAL81285.1
142		AAL81790.1
143		AAL80346.1
144		AAL80703.1
145		AAL81901.1
146		AAL81913.1
147		AAL80587.1
148		AFN04628.1
149	<i>Pyrodictum occultum</i>	WP_083494490.1
150	<i>Rhodothermus marinus</i>	WP_041806336.1
151		WP_012844425.1
152		ACY47561.1
153		ACY48134.1
154		ACY47672.1
155		ACY48911.1
156		WP_012843092.1
157		WP_012843709.1
158		WP_012844300.1
159		ACY48106.1
160		WP_012844667.1
161		WP_012845116.1
162		WP_012844208.1
163		WP_012843855.1
164		ACY47289.1
165	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	WP_012798605.1
166		ACY22623.1
167	<i>Staphylothermus marinus</i>	ABN70247.1
168		ABN69637.1
169		ABN69899.1
170	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AAY79446.1
171		WP_015385352.1
172		AAY80292.1

173	<i>Thermanaerothermophilus daxensis</i>	XPL83857.1
174	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	WP_004400108.1
179	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	WP_013788008.1
180	<i>Thermobifida halotolerans</i>	WP_068689397.1
181		WP_068692137.1
182	<i>Thermococcus celer</i>	WP_088862065.1
183		ASI98087.1
184	<i>Thermococcus litoralis</i>	EHR78031.1
185	<i>Thermococcus profundus</i>	WP_088857759.1
186	<i>Thermocrinis minervae</i>	WP_079653666.1
187	<i>Thermocrinis ruber</i>	AHE95294.1
188	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i>	WP_088571736.1
189	<i>Thermotoga lettingae</i>	ABV34293.1
190	<i>Thermotoga neapolitana</i>	WP_015919708.1
191		ACM22182.1
192		ACM22192.1
193		ACM22252.1
194		ACM22284.1
195		ACM22382.1
196		ACM22666.1
197		ACM22704.1
198		ACM22708.1
199		ACM22832.1
200		ACM22990.1
201		ACM23016.1
202		ACM23040.1
203		ACM23081.1
204		ACM23138.1
205		ACM23254.1
206		ACM23323.1
207		ACM23341.1
208		ACM23415.1
209		ACM23510.1
210		ACM23571.1
211		ACM23575.1
212		ACM23847.1
213		ACM23859.1
214		ACM23950.1
215		ACM23957.1
216		ACM24018.1

217	<i>Thermotoga petrophilia</i>	ABQ46309.1
218	<i>Thermus amyloliquefaciens</i>	WP_038055695.1
219	<i>Thermus filiformis</i>	WP_038062097.1
220	<i>Thermus thermophilus</i>	WP_096411270.1
221		AAS82270.1
222	<i>Truepera radiovictrix</i>	WP_013176662.1

Los genes de los aminoácidos seleccionados fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando síntesis de genes o ADN cromosómico (ADN genómico) de cada cepa cultivada, y el ADN amplificado fue insertado en el vector plásmido pET2la (Novagen) para expresión de *E. coli*. usando las enzimas de restricción NdeI y XhoI o Sall para construir vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21(DE3) usando una técnica de transformación general (consulte Sambrook et al. 1989) para producir microorganismos transformados.

Específicamente, la psicosa-6-fosfato fosfatasa de las SEQ ID NO: 26, 29, 53, 56, 60, 70, 76, 80, 81, 116, 117, 131, 134, 145, 167, 185, 186 y 191 se transformó en la cepa *E. coli* BL21(DE3) para preparar microorganismos transformados, que se denominaron *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap26, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap29, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap53, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap56, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap60, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap70, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap76, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap80, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap81, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap116, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap117, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap131, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap134, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap145, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap167, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap185, *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap186 y *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap191.

Los microorganismos transformados preparados de este modo fueron depositados en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM), una Autoridad Internacional de Depósito, el 14 de noviembre de 2018 con los Números de Acceso KCCM12390P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap26), KCCM12391P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap29), KCCM12392P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap53), KCCM12393P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap56), KCCM12394P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap60), KCCM12395P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap70), KCCM12396P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap76), KCCM12397P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap80), KCCM12398P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap81), KCCM12399P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap116),

KCCM12400P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap117), KCCM12401P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap131), KCCM12402P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap134), KCCM12403P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap145), KCCM12404P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap167), KCCM12405P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap185), KCCM12406P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap186) y KCCM12407P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap191).

Ejemplo 2: Preparación de enzimas recombinantes

Para poder preparar enzimas recombinantes, se inoculó un tubo de cultivo que contenía 5 ml de medio líquido LB con cada uno de los microorganismos transformados preparados en el Ejemplo 1. El cultivo de siembra se realizó en una incubadora con agitación a 37 °C hasta que se alcanzó una absorbancia de 2.0 a 600 nm. El caldo de cultivo obtenido a través del cultivo de siembra se inoculó en un matraz de cultivo que contenía el medio líquido LB, seguido del cultivo principal. Cuando la absorbancia del cultivo a 600 nm alcanzó 2.0, se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión y producción de una enzima recombinante. El cultivo se realizó a una velocidad de agitación de 180 rpm y la temperatura del cultivo se mantuvo a 37 °C. El caldo de cultivo se centrifugó a 8,000×g y a 4 °C durante 20 minutos para recuperar las células. Las células recuperadas se lavaron con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) dos veces y se resuspendieron en el mismo tampón, y las células se rompieron usando un homogeneizador ultrasónico. Los lisados celulares se centrifugaron a 13,000×g y 4 °C durante 20 minutos para obtener solo el sobrenadante. La enzima recombinante se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad con etiqueta His, y la enzima recombinante purificada se dializó frente a tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y luego se usó para la reacción posterior.

Ejemplo 3: Análisis de la actividad de desfosforilación de fosfato de azúcar y psicosa-6-fosfato

Después de la preparación de psicosa-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato, se confirmó la actividad de producción de psicosa por psicosa-6-fosfato fosfatasa, o la actividad se midió detectando psicosa mediante la adición adicional de tres enzimas usando glucosa-1-fosfato como el primer sustrato. En particular, glucosa, fructosa y psicosa, que son azúcares comunes producidos al mezclar cada una de las 222 fosfatasas de la presente solicitud con las tres enzimas (es decir, fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) o fosfomanomutasa (EC 5.4.2.8), que convierte glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato; glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9), que convierte glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato; y ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa o psicosa-6-fosfato-3-epimerasa, que

es una enzima que convierte la fructosa-6-fosfato en psicosa-6-fosfato) se evaluaron cualitativa y cuantitativamente.

Específicamente, se suspendió fructosa-6-fosfato 50 mM o glucosa-1-fosfato 20 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 7.0), fosfato sódico 50 mM (pH 6 a 7) o fosfato potásico 50 mM (pH 6 a 7), y luego 0.1 unidades/ml de fosfoglucomutasa; fosfomanomutasa, glucosa-6-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa; o psicosa-6-fosfato-3-epimerasa y cada una de las 222 psicosa-6-fosfato fosfatasas recombinantes preparadas en el Ejemplo 2 se le añadieron y la mezcla se dejó reaccionar de 45 °C a 70 °C durante 1 a 24 horas. La producción de glucosa, fructosa y psicosa se confirmó por HPLC, que se realizó utilizando una columna SP 0810 (Shodex) y una columna Aminex HPX-87C (Bio-RAD) a 80 °C con un caudal de fase móvil de 0.6 ml/min, y se detectó mediante un detector de índice de refracción (RID).

A partir de entonces, en la solución mixta preparada de glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato y psicosa-6-fosfato, se midió la actividad de desfosforilación de la psicosa-6-fosfato fosfatasa de la presente solicitud y la tasa de desfosforilación (selectiva) específica de psicosa-6-fosfato.

Específicamente, se añadieron 0.1 unidades/ml de cada una de la psicosa-6-fosfato fosfatasa y $MgCl_2$ (o $MgSO_4$) 5 mM a la solución mixta de glucosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosa-1-fosfato al 1% (p/v), fructosa-6-fosfato y psicosa-6-fosfato, y la mezcla se dejó reaccionar a 50 °C durante 12 horas. Los productos de reacción se analizaron por HPLC usando una columna Aminex HPX-87C (Bio-RAD), a 80 °C con un caudal de fase móvil de 0.6 ml/min. Se utilizó un detector de índice de refracción para detectar la producción de psicosa y otros sacáridos (fructosa y glucosa).

Como resultado, entre las 222 enzimas, 69 enzimas mostraron una alta actividad de desfosforilación selectiva para psicosa-6-fosfato y 45 enzimas mostraron una débil actividad de desfosforilación selectiva para psicosa-6-fosfato. Además, en 108 enzimas, no se pudo confirmar el título de desfosforilación para psicosa-6-fosfato selectiva. Sin embargo, la actividad de desfosforilación se confirmó en 221 enzimas excluyendo una de las 222 enzimas, de las cuales 113 enzimas mostraron una alta actividad de desfosforilación y 108 enzimas mostraron una baja actividad de desfosforilación. Mientras tanto, la enzima de la SEQ ID NO: 54, que se confirmó que no tiene título de desfosforilación, se conoce como enzima de desfosforilación, pero se confirmó que no tiene actividad de desfosforilación sustancial. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación.

A = Actividad baja (la tasa de conversión de desfosforilación de fosfato de azúcar a

azúcar simple es del 1 al 30%)

B = Actividad alta (la tasa de conversión de desfosforilación de fosfato de azúcar a azúcar simple es del 30% o más)

C = Sin actividad (la tasa de conversión de desfosforilación de fosfato de azúcar a azúcar simple es inferior al 1%)

Tabla 3

SEQ ID NO	Especie y género	No. NCBI	Actividad de desfosforilación de G1P/G6P/F6P/P6P	Actividad de desfosforilación de P6P(Selectiva)/G1P+G6P+F6P+P6P
1	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59297.1	B	B
2	<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>	KRW92667.1	A	C
3		WP_058093972.1	A	C
4	<i>Amycolatopsis thermoflava</i>	WP_017986193.1	A	C
5		WP_037323890.1	A	C
6	<i>Anaerolinea thermolimosa</i>	WP_084001059.1	B	B
7		WP_062189018.1	A	C
8	<i>Anaerolinea thermophila</i>	GAP08215.1	A	C
9		BAJ62794.1	B	B
10		KUK46216.1	A	C
11	<i>Archaeoglobus fugidus</i>	BAJ63987.1	A	C
12		AAB91288.1	B	B
13		AAB89113.1	B	A
14	<i>Archaeoglobus profundus</i>	AAB89416.1	B	A
15		WP_012940213.1	A	C
16	<i>Archaeoglobus veneficus</i>	WP_013683862.1	A	C
17	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41557.1	B	A
18		AAU39603.1	B	A
19		AAU43073.1	A	C
20	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	ACM59531.1	B	A
21		ACM59457.1	B	A
22		ACM61198.1	B	A
23		ACM61211.1	B	A
24		ACM60182.1	A	C
25	<i>Caldilinea aerophila</i>	BAL98676.1	B	A
26		BAM00874.1	B	B
27		WP_014433277.1	A	C
28	<i>Caldithrix abyssi</i>	APF18124.1	B	A
29		APF18744.1	B	B
30		APF16831.1	A	C
31		WP_006929206.1	A	C
32	<i>Carboxydocella</i> sp. UL01	WP_079933669.1	A	C
33	<i>Carboxydotherrmus ferrireducens</i>	WP_028051691.1	A	C
34		WP_028051711.1	A	C

35		WP_028053062.1	A	C
36	<i>Chloroflexi bacterium</i> 54-19	OJW02856.1	A	C
37	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	WP_045087739.1	B	A
38	<i>Deinococcus aerius</i>	WP_103127908.1	B	B
39	<i>Deinococcus apachensis</i>	WP_019584763.1	B	B
40	<i>Deinococcus aquatilis</i>	WP_019011981.1	B	B
41	<i>Deinococcus geothermalis</i>	WP_011529832.1	B	B
42	<i>Deinococcus hopiensis</i>	WP_084049191.1	B	B
43	<i>Deinococcus maricopensis</i>	WP_013556873.1	B	B
44	<i>Deinococcus murrayi</i>	WP_084542862.1	B	A
45		WP_051363537.1	B	B
46	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>	WP_092263046.1	B	B
47	<i>Deinococcus wulumugiensis</i>	WP_017870657.1	B	B
48	<i>Deinococcus</i> sp. Leaf326	WP_056297006.1	B	B
49	<i>Deinococcus phoenicis</i>	WP_034353069.1	B	B
50	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	WP_013614672.1	B	B
51	<i>Deinococcus</i> sp. 17bor-2	WP_109826642.1	B	B
52	<i>Deinococcus</i> sp. NW-56	WP_104990527.1	B	B
53	<i>Deinococcus</i> sp. RL	KEF35131.1	B	B
54		WP_081851636.1	C	C
55	<i>Deinococcus</i> sp. YIM 77859	WP_034384462.1	B	A
56	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	ADV64381.1	B	B
57		ADV64382.1	B	B
58		ADV64566.1	A	C
59	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	YP_002352793.1	B	B
60		YP_002353123.1	B	B
61		YP_002352154.1	B	A
62	<i>Effusibacillus pohliae</i>	WP_018132070.1	A	C
63	<i>Fervidobacterium gondwanense</i>	WP_072759218.1	A	C
64	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	AMW32328.1	B	B
65		AMW33413.1	B	B
66	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	ABS60322.1	B	B
67		ABS61294.1	A	C
68	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	AFG34634.1	A	C
69		AFG35917.1	B	B
70		WP_064011782.1	B	B

71	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_011232549.1	A	C
72	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ALA69320.1	B	B
73		ALA71677.1	B	A
74		ALA71036.1	A	C
75		ALA70927.1	A	C
76		ALA69332.1	B	B
77	<i>Halococcus salifodinae</i>	WP_005045395.1	B	A
78		EMA49396.1	A	C
79		EMA52756.1	A	C
80	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	WP_008285887.1	B	B
81	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	WP_096602199.1	B	B
82		WP_096601840.1	A	C
83	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	WP_012963417.1	A	C
84	<i>Hyperthermus butylicus</i>	ABM80367.1	A	C
85	<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	WP_084251417.1	B	A
86	<i>Kosmotoga olearia</i>	ACR80305.1	A	C
87		ACR80819.1	A	C
88	<i>Marinitoga piezophila</i>	AEX84499.1	B	A
89		AEX85453.1	A	C
90		AEX85799.1	A	C
91	<i>Meiothermus cerbereus</i>	WP_027877060.1	B	B
92		WP_027878515.1	B	B
93	<i>Meiothermus chliarophilus</i>	WP_027892542.1	B	B
94		WP_051304156.1	A	C
95	<i>Meiothermus ruber</i>	ADD26908.1	B	B
96		WP_013013826.1	A	C
97		WP_013013825.1	A	C
98		WP_013012548.1	A	C
99		WP_027883570.1	B	B
100	<i>Meiothermus silvanus</i>	ADH63424.1	B	B
101		WP_013157023.1	B	B
102	<i>Meiothermus taiwanensis</i>	WP_027888084.1	B	B
103		WP_027888305.1	B	B

104	<i>Meiothermus timidus</i>	WP_018466213.1	B	A
105		WP_018465080.1	B	A
106		WP_018467688.1	A	C
107		WP_018467518.1	A	C
108		WP_018465603.1	B	A
109		WP_018466116.1	A	C
110		WP_018467797.1	A	C
111		WP_018467420.1	A	C
112		WP_018466214.1	A	C
113		WP_018465420.1	B	B
114	<i>Meiothermus rufus</i>	WP_036271046.1	B	B
115	<i>Mesotoga infera</i>	KUK90417.1	A	C
116	<i>Metallosphaera sedula</i>	ABP94905.1	B	B
117	<i>Methanocella conradii</i>	AFC99407.1	B	B
118		WP_014405429.1	A	C
119		AFD00405.1	A	C
120	<i>Methanococcoides methylutens</i>	WP_048194361.1	A	C
121		AKB84306.1	A	C
122	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	ADI75005.1	B	A
123		WP_013193898.1	A	C
124	<i>Methanohalobius tindarius</i>	WP_048135864.1	A	C
125		WP_048135649.1	A	C
126		ETA67773.1	A	C
127	<i>Methanosarcina siciliae</i>	WP_048179383.1	A	C
128		AKB37722.1	A	C
129		AKB35909.1	A	C
130	<i>Methanothermobacter thermophilus</i>	ADP76907.1	A	C
131	<i>Petrotoga mobilis</i>	ABX30802.1	B	B
132		KUK15285.1	A	C
133	<i>Picrophilus torridus</i>	AAT44010.1	B	A
134		AAT43693.1	B	B
135	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	WP_073456926.1	A	C

136	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AAL80556.1	B	B
137		AAL81109.1	A	C
138		WP_014835302.1	A	C
139		AAL82045.1	A	C
140		AAL82122.1	A	C
141		AAL81285.1	A	C
142		AAL81790.1	B	B
143		AAL80346.1	B	A
144		AAL80703.1	B	A
145		AAL81901.1	B	B
146		AAL81913.1	B	B
147		AAL80587.1	B	A
148		AFN04628.1	B	B
149	<i>Pyrodictium occultum</i>	WP_083494490.1	A	C
150	<i>Rhodothermus marinus</i>	WP_041806336.1	B	A
151		WP_012844425.1	B	A
152		ACY47561.1	B	A
153		ACY48134.1	A	C
154		ACY47672.1	B	A
155		ACY48911.1	B	A
156		WP_012843092.1	B	A
157		WP_012843709.1	A	C
158		WP_012844300.1	A	C
159		ACY48106.1	B	A
160		WP_012844667.1	B	A
161		WP_012845116.1	B	A
162		WP_012844208.1	B	A
163		WP_012843855.1	B	A
164		ACY47289.1	B	B
165	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	WP_012798605.1	A	C
166		ACY22623.1	A	C
167	<i>Staphylothermus marinus</i>	ABN70247.1	B	B
168		ABN69637.1	A	C
169		ABN69899.1	B	B

170	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AAV79446.1	A	C
171		WP_015385352.1	A	C
172		AAV80292.1	B	B
173	<i>Thermanaerothermophilus duxensis</i>	KPL83857.1	B	A
174	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	WP_004400108.1	A	C
175	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	WP_074592559.1	B	A
176		WP_074665888.1	A	C
177	<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i>	AEM79256.1	B	B
178		AEM79130.1	A	C
179	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	WP_013788008.1	A	C
180	<i>Thermobifida halotolerans</i>	WP_068689397.1	A	C
181		WP_068692137.1	A	C
182	<i>Thermococcus celer</i>	WP_088862065.1	A	C
183		ASI98087.1	A	C
184	<i>Thermococcus litoralis</i>	EHR78031.1	B	B
185	<i>Thermococcus profundus</i>	WP_088857759.1	B	B
186	<i>Thermocrinis minervae</i>	WP_079653666.1	B	B
187	<i>Thermocrinis ruber</i>	AHE95294.1	B	B
188	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i>	WP_088571736.1	A	C
189	<i>Thermotoga lettingae</i>	ABV34293.1	B	B

190	<i>Thermotoga neapolitana</i>	WP_015919708.1	A	C
191		ACM22182.1	B	B
192		ACM22192.1	B	B
193		ACM22252.1	A	C
194		ACM22284.1	A	C
195		ACM22382.1	B	A
196		ACM22666.1	A	C
197		ACM22704.1	A	C
198		ACM22708.1	B	A
199		ACM22832.1	A	C
200		ACM22990.1	A	C
201		ACM23016.1	A	C
202		ACM23040.1	A	C
203		ACM23081.1	A	C
204		ACM23138.1	A	C
205		ACM23254.1	A	A
206		ACM23323.1	A	C
207		ACM23341.1	A	C
208		ACM23415.1	A	C
209		ACM23510.1	A	C
210		ACM23571.1	B	A
211		ACM23575.1	B	B
212		ACM23847.1	A	C
213		ACM23859.1	A	C
214		ACM23950.1	B	A
215		ACM23957.1	A	C
216		ACM24018.1	B	A
217	<i>Thermotoga petrophilia</i>	ABQ46309.1	B	B
218	<i>Thermus amyloliquefaciens</i>	WP_038055695.1	A	C
219	<i>Thermus filiformis</i>	WP_038062097.1	A	C
220	<i>Thermus thermophilus</i>	WP_096411270.1	A	C
221		AAS82270.1	B	B
222	<i>Truepera radiovictrix</i>	WP_013176662.1	A	C

Ejemplo 4: Análisis de la actividad de producción de psicosa mediante múltiples reacciones enzimáticas (múltiples enzimas)

Para la producción de psicosa a partir de maltodextrina, se seleccionaron siete enzimas y se hicieron reaccionar simultáneamente (un solo recipiente). Como las siete
 5 enzimas, glucano fosforilasa, que degrada el almidón y lo convierte en glucosa-1-fosfato, pululanasa, que desramifica el almidón, 4- α -glucanotransferasa, que aumenta la utilización del sustrato de almidón, fosfoglucomutasa, que convierte la glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato isomerasa, que convierte glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, psicosa-6-fosfato-3-epimerasa, que convierte fructosa-6-fosfato en
 10 psicosa-6-fosfato y enzimas de las SEQ ID NO: 1 a 222 capaces de producir psicosa a partir de psicosa-6-fosfato se prepararon y se usaron en una cantidad de 0.1 unidades/ml. Se añadió maltodextrina al 5% (p/v) a $MgCl_2$ de 1 mM a 5 mM y fosfato de sodio de 10 mM a 50 mM (pH 7.0) y la mezcla se dejó reaccionar a una temperatura de 50 °C durante 12 horas. Los productos de reacción se analizaron por HPLC usando una columna
 15 Aminex HPX-87C (Bio-RAD) a 80 °C a un caudal de fase móvil de 0.6 ml/min y se detectaron usando un detector de índice de refracción.

Como resultado, se confirmó que la psicosa se producía a partir de maltodextrina a través de múltiples reacciones enzimáticas.

Si bien la presente solicitud ha sido descrita con referencia a las realizaciones
 20 ilustrativas particulares, los expertos en la técnica a los que pertenece la presente solicitud entenderán que la presente solicitud puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu técnico o de las características esenciales de la presente solicitud. Por lo tanto, las realizaciones descritas anteriormente se consideran ilustrativas en todos los aspectos y no restrictivas. Además, el alcance de la presente
 25 solicitud está definido por las reivindicaciones adjuntas en lugar de la descripción detallada, y debe entenderse que todas las modificaciones o variaciones derivadas de los significados y alcance de la presente solicitud y sus equivalentes están incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

NÚMEROS DE DEPÓSITO

Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
 No. de Acceso: KCCM12390P
 Fecha de Depósito: 20181114
 Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
 35 No. de Acceso: KCCM12391P

	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12392P
	Fecha de Depósito: 20181114
5	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12393P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12394P
10	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12395P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
15	No. de Acceso: KCCM12396P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12397P
	Fecha de Depósito: 20181114
20	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12398P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12399P
25	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12400P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
30	No. de Acceso: KCCM12401P
	Fecha de Depósito: 20181114
	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
	No. de Acceso: KCCM12402P
	Fecha de Depósito: 20181114
35	Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)

- No. de Acceso: KCCM12403P
Fecha de Depósito: 20181114
Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
- 5 No. de Acceso: KCCM12404P
Fecha de Depósito: 20181114
Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
- No. de Acceso: KCCM12405P
Fecha de Depósito: 20181114
Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
- 10 No. de Acceso: KCCM12406P
Fecha de Depósito: 20181114
Institución de Depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM)
- No. de Acceso: KCCM12407P
Fecha de Depósito: 20181114