

COMPOSICIONES ENZIMÁTICAS INMOVILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE HEXOSAS

Referencia Reciproca a Solicitudes Relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de los Estados Unidos No. 62/875.321, presentada el 17 de julio de 2019, y la solicitud de los Estados Unidos No. 62/924.323, presentada el 22 de octubre de 2019, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Campo de la Invención

[0002] La invención se refiere a la preparación de monosacáridos de hexosa utilizando composiciones de enzimas inmovilizadas. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para preparar una D-hexosa (o hexosa) a partir de sacáridos (ej., polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos, sacarosa, D-glucosa y D-fructosa) que incluye un paso en el que la fructosa 6-fosfato se convierte en hexosa por uno o más pasos enzimáticos catalizados por enzimas inmovilizadas.

Fundamento

[0003] Las hexosas son monosacáridos con seis átomos de carbono. Las hexosas incluyen, por ejemplo, tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa e inositol. Las hexosas se utilizan en numerosas industrias, teniendo claramente una variedad de aplicaciones en la industria farmacéutica, biotecnología y en las industrias de alimentos y bebidas. Las hexosas se pueden preparar usando procesos enzimáticos a partir de sacáridos, como, por ejemplo, monosacáridos, oligosacáridos, almidón, derivados de almidón, celulosa y similares. Los procesos enzimáticos basados en soluciones se describen en las solicitudes PCT publicadas WO 2018/169957, WO 2017/059278 y WO 2018/112139, que se incorporan aquí como referencia.

[0004] El desarrollo comercial de los procesos enzimáticos es fundamental para aumentar el número de procesos industriales que utilizan química verde y, por tanto, disminuir el impacto de la síntesis en el medio ambiente. Se han desarrollado numerosos procesos enzimáticos para la producción comercial (ej., solicitudes PCT WO 2018/169957, WO 2017/059278 y WO 2018/112139), pero cuando estos procesos son para productos de bajo costo (como edulcorantes alternativos), los obstáculos para la comercialización surgen en relación con el costo de utilización de la enzima. Una solución común a este problema es la inmovilización de enzimas

en un transportador (ej., WO 2016/160573). La inmovilización permite que la enzima se reutilice entre lotes o se utilice en un proceso continuo. La capacidad de reutilizar enzimas reduce en gran medida el costo de utilización de la enzima por kg de producto y puede ser esencial para la viabilidad comercial. Existen numerosos métodos para la inmovilización de enzimas sin reglas establecidas sobre qué método será preferido por un proceso específico (Datta, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech (2013), 3:1-9). Por lo tanto, se deben desarrollar soluciones únicas para cada proceso.

[0005] Las enzimas en los procesos comerciales pueden adsorberse sobre soportes orgánicos o inorgánicos insolubles comúnmente utilizados para mejorar la funcionalidad, como se conoce en la técnica. Estos incluyen soportes poliméricos como agarosa, metacrilato, poliestireno, fenol formaldehído o dextrano, así como soportes inorgánicos tales como vidrio, metal o materiales a base de carbono. Estos materiales a menudo se producen con grandes proporciones de superficie a volumen y superficies especializadas que promueven la unión y la actividad de las enzimas inmovilizadas. Las enzimas pueden unirse a estos soportes sólidos a través de interacciones covalentes, iónicas o hidrofóbicas. Las enzimas también podrían fijarse a través de interacciones modificadas genéticamente, como la fusión covalente con otra proteína o secuencia peptídica con afinidad con el soporte sólido, más a menudo una secuencia de polihistidina. Las enzimas pueden fijarse directamente a la superficie o al revestimiento de la superficie, o pueden fijarse a otras proteínas ya presentes en la superficie o el revestimiento de la superficie. Las enzimas se pueden inmovilizar en un solo transportador, en transportadores individuales o en una combinación de los dos (ej., dos enzimas por transportador y luego mezclar esos transportadores). Estas variaciones se pueden mezclar uniformemente o en capas definidas para optimizar la rotación en un reactor continuo. Estas enzimas se pueden mezclar uniformemente o en capas o zonas definidas para optimizar la renovación. Por ejemplo, el comienzo del reactor puede tener una capa de aGP para asegurar un alto aumento inicial de G1P. Las enzimas pueden inmovilizarse todas en una perla transportadora, cada una en una perla transportadora individual o en grupos de enzimas en una perla transportadora. De forma similar, las enzimas pueden inmovilizarse en un transportador específico o múltiples transportadores dentro de un proceso usando una o más metodologías de inmovilización.

[0006] Existe la necesidad de tener procesos mejorados para la producción de hexosas que permitan escalabilidad y composiciones enzimáticas reutilizables mientras se logran altos rendimientos de la hexosa deseada.

Resumen de la invención

[0007] La invención se refiere a composiciones de enzimas inmovilizadas para la preparación de una hexosa. Las hexosas incluyen, por ejemplo, tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa e inositol. Una composición de enzimas inmovilizadas de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete, o al menos ocho de las siguientes enzimas inmovilizadas a al menos un transportador o una mezcla de transportadores:

- a) α glucano fosforilasa (α GP), fosfoglucomutasa (PGM), y opcionalmente 1,4-glucano transferasa (4-GT); y
- b) una enzima dentro de una combinación de enzimas seleccionadas de:
 - (i) fosfoglucoisomerasa (PGI), fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE) y tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP) para preparar tagatosa;
 - (ii) fosfoglucoisomerasa (PGI), psicosa-6-fosfato epimerasa (P6PE) y picosa-6-fosfato fosfatasa (P6PP) para preparar alulosa;
 - (iii) fosfoglucoisomerasa (PGI), P6PE, alosa-6-fosfato isomerasa (A6PI) y alosa-6-fosfato fosfatasa (A6PP) para preparar alosa;
 - (iv) fosfoglucoisomerasa (PGI), manosa-6-fosfato isomerasa (M6PI) o fosfoglucosa/fosfomanosa isomerasa (PGPMI) y manosa 6-fosfato fosfatasa (M6PP) para preparar manosa;
 - (v) fosfoglucoisomerasa (PGI), F6PE, galactosa 6-fosfato isomerasa (Gal6PI) y galactosa 6-fosfato fosfatasa (Gal6PP) para preparar galactosa;
 - (vi) PGI y fructosa 6-fosfato fosfatasa (F6PP) para preparar fructosa;
 - (vii) PGI, P6PE, altrosa 6-fosfato isomerasa (Alt6PI) y altrosa 6-fosfato fosfatasa (Alt6PP) para preparar altrosa;
 - (viii) PGI, F6PE, talosa 6-fosfato isomerasa (Tal6PI) y talosa 6-fosfato fosfatasa (Tal6PP) para preparar talosa;
 - (ix) PGI, F6PE, sorbosa 6-fosfato epimerasa (S6PE) y sorbosa 6-fosfato fosfatasa (S6PP) para preparar sorbosa;
 - (x) PGI, F6PE, S6PE, gulosa 6-fosfato isomerasa (Gul6PI) y gulosa 6-fosfato fosfatasa (Gul6PP) para preparar gulosa;
 - (xi) PGI, F6PE, S6PE, idosa 6-fosfato isomerasa (I6PI) e idosa 6-fosfato fosfatasa (I6PP) para preparar idosa; y

(xii) inositol 3-fosfato sintasa (IPS) e inositol monofosfatasa (IMP) para preparar inositol.

En una composición de enzimas inmovilizadas de la invención, el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) oscila entre 0,1 % y 40 %.

[0008] La invención también se refiere a un proceso enzimático para preparar una hexosa a partir de un sacárido poniendo en contacto un derivado de almidón con una composición enzimática inmovilizada de la invención en condiciones de reacción adecuadas para convertir el derivado de almidón en hexosa.

Breve Descripción de las Figuras

[0009] La FIG. 1A es un gráfico que muestra las cantidades de enzima en una composición de enzima inmovilizada que está optimizada para la producción de tagatosa.

[0010] La FIG. 1B es un gráfico que muestra las cantidades de enzima en una composición de enzima inmovilizada en la que las cantidades se normalizan en función de la velocidad de reacción observada de cada enzima en relación con la actividad de T6PP para tener unidades iguales de actividad dentro de la cascada.

[0011] La FIG. 1C es un gráfico que muestra las cantidades de enzima en una composición de enzima inmovilizada en la que las cantidades estaban en proporciones p/p de 1:1:1:1:1.

[0012] La FIG. 2 es un gráfico que muestra la relación de la carga de enzima (% p/p del peso total de la enzima/peso del transportador) sobre la actividad de una composición de enzima inmovilizada que está optimizada para la producción de tagatosa en DUOLITE™ A568. Los resultados que se muestran se basan en tasas de cascada enzimática relativas con respecto a un transportador cargado al 5%.

Descripción detallada

[0013] La siguiente descripción describe la invención de acuerdo con modalidades relacionadas con la fabricación y el uso de enzimas que están inmovilizadas en un transportador ("composiciones de enzimas inmovilizadas") en procesos para convertir almidones y derivados de almidón y sacáridos en monosacáridos de hexosa, incluidos, por ejemplo, tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa e inositol. Estos procesos generalmente se pueden describir como reacciones enzimáticas que crean un intermedio fosforilado a partir de almidón, un derivado de almidón o un sacárido usando fosfato libre (sin ATP). El fosfato libre se libera en un paso final energéticamente favorable para producir una hexosa de interés (ej., tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa,

talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol). Luego, el fosfato se recicla para convertir almidón adicional, derivado de almidón o un sacárido en un intermedio fosforilado para que el proceso pueda repetirse. Esto permite que se utilicen cantidades no estequiométricas de fosfato, lo que reduce el costo del uso de fosfato en el proceso y limita los niveles de fosfato en los desechos.

[0014] Las modalidades de la invención incluyen composiciones de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete u al menos ocho enzimas, que están inmovilizadas en un transportador y que catalizan, respectivamente, reacciones en un proceso enzimático para convertir un almidón, un derivado de almidón y/o un sacárido en una hexosa. Una composición de enzima inmovilizada de la invención proporciona numerosas ventajas sobre su uso en solución libre, que incluyen: mayor duración de la actividad (debido a la protección de las características estructurales de la proteína), reutilización de ciclos múltiples y eliminación de la necesidad de eliminar la enzima aguas abajo. Además, la inmovilización de enzimas en superficies sólidas puede funcionar en un reactor de tanque agitado, un reactor de lecho empacado o un reactor de lecho giratorio; permitiendo flexibilidad en la ampliación.

[0015] Las enzimas contenidas en una composición enzimática inmovilizada de la invención catalizan al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete, o al menos ocho, reacciones involucradas en la conversión por etapas de un almidón, derivado de almidón o sacáridos a una hexosa. Las siguientes publicaciones de patentes, que se describen aquí en su totalidad, describen procesos enzimáticos (es decir, cascadas de reacción enzimática) para producir hexosas en solución: solicitudes PCT publicadas WO 2018/169957, WO 2017/059278 y WO 2018/112139. Las composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera de las enzimas y combinaciones de enzimas descritas en estas referencias.

[0016] Algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención contienen una combinación de enzimas que catalizan reacciones, que son comunes entre los procesos para producir diferentes hexosas, tales como etapas de reacción que conducen a la conversión de glucosa 6-fosfato (G6P) en fructosa 6-fosfato (F6P). Las enzimas que catalizan estos pasos de reacción comunes pueden denominarse "enzimas centrales". En consecuencia, en algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención, una composición de enzimas inmovilizadas contiene al menos las enzimas centrales, α glucano fosforilasa (α GP) para convertir un sacárido en glucosa 1-fosfato (G1P) y fosfoglucomutasa (PGM) para convertir G1P en glucosa 6-fosfato (G6P). Las enzimas en una composición enzimática inmovilizada de la

invención, que catalizan etapas de reacción adicionales para convertir G6P en diversos productos de hexosa, pueden estar coinmovilizadas con enzimas centrales o contenidas en composiciones enzimáticas inmovilizadas separadas.

[0017] Típicamente, las enzimas centrales se combinan en una composición inmovilizada con una o más enzimas utilizadas en la producción de tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol. En consecuencia, además de α GP y PGM, algunas composiciones de enzimas inmovilizadas según la invención también contienen: (i) fosfoglucoisomerasa (PGI), fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE) y tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP) para preparar tagatosa; (ii) IGP, piscosa-6-fosfato epimerasa (P6PE) y pícica-6-fosfato fosfatasa (P6PP) para preparar alulosa; (iii) PGI, P6PE, alosa-6-fosfato isomerasa (A6PI) y alosa-6-fosfato fosfatasa (A6PP) para preparar alosa; (iv) PGI, manosa-6-fosfato isomerasa (M6PI) o fosfoglucosa/fosfomanosa isomerasa (PGPMI) y manosa 6-fosfato fosfatasa (M6PP) para preparar manosa; (v) PGI, F6PE, galactosa 6-fosfato isomerasa (Gal6PI) y galactosa 6-fosfato fosfatasa (Gal6PP) para preparar galactosa; (vi) PGI y fructosa 6-fosfato fosfatasa (F6PP) para preparar fructosa; (vii) PGI, P6PE, altrosa 6-fosfato isomerasa (Alt6PI) y altrosa 6-fosfato fosfatasa (Alt6PP) para preparar altrosa; (viii) PGI, F6PE, talosa 6-fosfato isomerasa (Tal6PI) y talosa 6-fosfato fosfatasa (Tal6PP) para preparar talosa; (ix) PGI, F6PE, sorbosa 6-fosfato epimerasa (S6PE) y sorbosa 6-fosfato fosfatasa (S6PP) para preparar talosa; (x) PGI, F6PE, S6PE, gulosa 6-fosfato isomerasa (Gul6PI) y gulosa 6-fosfato fosfatasa (Gul6PP) para preparar gulosa; (xi) PGI, F6PE, S6PE, idosa 6-fosfato isomerasa (I6PI) e idosa 6-fosfato fosfatasa (I6PP) para preparar idosa; y (xii) inositol 3-fosfato sintasa (IPS) e inositol monofosfatasa (IMP) para preparar inositol. Cada combinación de enzimas centrales y una composición enzimática (i) - (xii) son modalidades separadas de la invención.

[0018] Las composiciones de enzimas inmovilizadas, anteriores, también pueden contener opcionalmente 4-glucano transferasa (4GT). 4GT se puede utilizar para aumentar los rendimientos de hexosa al reciclar los productos de degradación glucosa, maltosa y maltotriosa en maltooligosacáridos más largos; que puede escindirse fosforolíticamente por α GP para producir G1P.

[0019] Las proporciones de peso relativo entre las enzimas en una composición enzimática inmovilizada de la invención pueden oscilar entre 1:1000 y 1000:1, entre 1:100 y 100:1 o entre 1:50 y 50:1, cuando se comparan dos enzimas en la composición inmovilizada. Las proporciones de enzimas, incluidas otras enzimas opcionales analizadas a continuación, se pueden variar para aumentar la eficiencia de la producción de hexosa. Por ejemplo, una enzima particular puede

estar presente en una cantidad de aproximadamente 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, etc. en relación con la cantidad de otra enzima.

[0020] Las relaciones peso/peso relativas entre las enzimas en una composición enzimática inmovilizada de la invención pueden optimizarse para aumentar el rendimiento del proceso y/o el rendimiento de hexosa. En ese sentido, el peso de cada enzima en una composición enzimática inmovilizada, en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) oscila entre 0,1% y 70%. Por ejemplo, algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención contienen 10-30% (α GP); 10-30% (PGM); y cuando está presente 0,1-10% (PGI) y 0,1-10% (4GT), cuando está presente. Por ejemplo, una composición enzimática inmovilizada de la invención que puede usarse para la producción de tagatosa, el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) es: 10-30% (α GP); 0-10% (4GT); 10-30% (PGM); 0,1-10% (IGP); 15-35% (F6PE); y T6PP (25-45%), en donde el peso total de enzimas en la composición es 100 %p/p con respecto al peso total de las enzimas. Algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención para usar en la producción de tagatosa contienen: 19% α GP; 3% 4GT; 17% PGM; 3% IGP; 23% F6PE; y T6PP 35 %, en donde el % en peso de cada enzima es en relación con el peso total de las enzimas en la composición de enzimas inmovilizadas de la invención, y el peso total de las enzimas en la composición es 100 %p/p en relación con el peso total de las enzimas. En otros ejemplos, una composición enzimática inmovilizada de la invención para usarse para la producción de alulosa, en la que el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) es: 10-30% (α GP); 0-10% (4GT); 10-30% (PGM); 0,1-10% (IGP); 0,1-10% (P6PE); y (45-65%) P6PP, en donde el peso total de enzimas en la composición totaliza 100 %p/p con respecto al peso total de las enzimas. Algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención para usar en la producción de alulosa contienen: 20% α GP; 3% 4GT; 16,5% PGM; 3% IGP; 3% P6PE; y P6PP 54 %, en donde el % en peso de cada enzima es en relación con el peso total de las enzimas en la composición de enzimas inmovilizadas de la invención, y el peso total de las enzimas en la composición es 100 % p/p en relación con el peso total de las enzimas.

[0021] Si bien las enzimas contenidas en las composiciones inmovilizadas de la invención generalmente se denominan en función de las reacciones que catalizan (es decir, por especificidad y función), las enzimas también se identifican comúnmente por la secuencia de aminoácidos (ej., una SEQ. ID. NO.; un número de identificación de la base de datos, como UniProt ID), identidad/similitud de la secuencia de aminoácidos con una enzima de función conocida, secuencia de nucleótidos o identidad/similitud de la secuencia de nucleótidos con una

enzima de función conocida. Las enzimas conocidas en la técnica y usadas para preparar hexosas se pueden usar en una composición de enzimas inmovilizadas de la invención, incluidas las composiciones de enzimas inmovilizadas que se pueden usar para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa e inositol. Ejemplos de enzimas conocidas en la técnica que se pueden usar en una composición de enzima inmovilizada de la invención se identifican a continuación con un documento de patente relevante. La descripción de las enzimas en las patentes enumeradas se incorpora aquí específicamente como referencia.

αGP

WO2018/129275A1
WO2017059278
WO2018/112139
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483
US20190194696A1
CN106811493A

PGM

WO2018/129275A1
WO2017059278
WO2018/112139
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483
US20190194696A1

PGI

WO2018/129275A1
WO2017059278
WO2018/112139
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483
US20190194696A1

F6PE

WO2015/016544
WO2017059278
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483

T6PP

WO2018004310A1
WO2017059278
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483

4GT

WO2017059278
WO2018/112139
PCT/US2019/056978
PCT/US2019/058483
US20190194696A1
CN106811493A

P6PE

WO2018004308A2
WO2018/129275A1
WO2018/112139

P6PP

WO2018/112139
WO2018/129275A1

En consecuencia, en ciertas composiciones de enzimas inmovilizadas, la Tabla 1 proporciona un UniProt ID y SEQ. ID No. para identificar las secuencias de aminoácidos para los siguientes ejemplos no limitantes de enzimas que se pueden incluir en las composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención: αGP, PGM, PGI, F6PE, T6PP, 4-GT, P6PE, y P6PP.

Tabla 1

Enzima	Identificación de UniProt (SEC. ID. NO.)
α glucano fosforilasa (αGP)	G8NCC0 (SEQ. ID. NO. 1)
Fosfoglucomutasa (PGM)	A0A0P6YKY9 (SEQ. ID. NO. 2)
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	Q5SLL6 (SEQ. ID. NO. 3)

fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE)	A0A0P6XN50 (SEQ. ID. NO. 4)
tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP)	D1C7G9 (SEQ. ID. NO. 5)
1,4-glucano transferasa (4-GT)	E8MXP8 (SEQ. ID. NO. 6)
psicosa 6-fosfato 3-epimerasa (P6PE)	A0A223HZI7 (SEQ. ID. NO. 7)
psicosa 6-fosfato fosfatasa (P6PP)	A0A0E3NCH4 (SEQ. ID. NO. 8)

[0022] Las secuencias de aminoácidos de las enzimas contenidas en las composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención también incluyen enzimas, que pueden haber sido modificadas por cualquier motivo, como, por ejemplo, para mejorar la actividad, la estabilidad (es decir, la semivida) o el rendimiento. Tales enzimas modificadas incluyen, por ejemplo, fragmentos de enzimas, sustituciones de aminoácidos y proteínas quiméricas. Las enzimas modificadas incluyen variantes de cualquier enzima descrita en el presente documento. Las variantes pueden contener sustituciones de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos. Una variante incluye no más de 15, no más de 12, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 sustitución de aminoácido conservadora en relación con una enzima natural y/o no más de 5, no más de 4, no más de 3 o no más de 2 sustituciones de aminoácidos no conservadoras, o no más de 1 sustitución de aminoácido no conservadora, en relación con una enzima natural. Una sustitución de aminoácido conservadora es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*ej.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (*ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano). Las enzimas variantes de la invención pueden incluir sustituciones de aminoácidos con análogos de aminoácidos, así como con aminoácidos, como se describe en el presente documento.

[0023] Una enzima contenida en una composición enzimática de la invención también puede ser una enzima que: i) comparte al menos un 35% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una enzima descrita en el presente documento; y ii) puede catalizar la misma reacción de esa enzima dada a conocer en particular con la especificidad necesaria para el

proceso. Por consiguiente, una enzima en una composición de la invención incluye enzimas con secuencias de aminoácidos que son al menos 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una enzima descrita en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia" se refiere a la similitud entre dos o más secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. La identidad de secuencia se mide normalmente en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología) entre secuencias de aminoácidos; cuanto mayor sea el porcentaje, más similares entre sí son las secuencias comparadas.

[0024] Como se describió anteriormente, las composiciones enzimáticas de la invención se inmovilizan en al menos un transportador. Un transportador también puede denominarse en general en el presente documento como "material transportador", "resina transportadora" o "perla transportadora". En una composición de enzimas inmovilizadas de la invención, se pueden usar múltiples transportadores diferentes para inmovilizar una o más enzimas. Si bien los transportadores en las composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención no se limitan necesariamente a un material en particular, en algunas composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención, el transportador es una resina de intercambio iónico de base débil que, opcionalmente, puede estar compuesta de fenol formaldehído (es decir, un policondensado de fenol formaldehído). En otras composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención, el material transportador se basa en partículas de vidrio de poro controlado (CPG) o partículas de CPG híbridas (WO2015115993A1). Los transportadores en algunas composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención se funcionalizan mediante la inclusión de un grupo amino terciario, mientras que, en otras, un grupo amino secundario proporciona funcionalidad. En algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención, una resina transportadora se funcionaliza con grupos usados para quelar un metal, como, por ejemplo, hierro o zinc. Los grupos metálicos quelados permiten la unión de moléculas de alta afinidad a través de un grupo de unión apropiado, como, por ejemplo, una etiqueta de histidina (His). Se encuentran ejemplos de tales grupos funcionales en WO2015115993A1 y Cassimjee, A general protein purification and immobilization method on controlled porosity glass: biocatalytic applications. Chem. Commun., 2014, 50, 9134; incluyendo, pero sin limitarse a residuos de 2,4-dihidroxibencilo.

[0025] Los transportadores en algunas composiciones de enzimas inmovilizadas de la invención poseen dos o más de las diversas características de los transportadores que se enumeran anteriormente. Por ejemplo, en algunas composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención, las composiciones enzimáticas de cualquiera de las composiciones enzimáticas inmovilizadas descritas en el presente documento, para uso en procesos para convertir almidones y derivados de almidón y sacáridos en monosacáridos de hexosa, incluidos procesos para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol, se inmovilizan en una resina de intercambio aniónico de base débil; que puede o no estar compuesto por policondensado de fenol formaldehído; y que puede o no estar funcionalizado por un grupo amino terciario. Una resina transportadora con las características anteriores se vende comercialmente como DUOLITE™ A568. En otras composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención, las composiciones enzimáticas de cualquiera de las composiciones enzimáticas inmovilizadas descritas en el presente documento, para uso en procesos que convierten almidones y derivados de almidón y sacáridos en monosacáridos de hexosa, incluidos procesos para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol, se inmovilizan en una resina de intercambio aniónico de base débil; que puede o no estar compuesto por policondensado de fenol formaldehído; y que puede o no estar funcionalizado por un grupo amino secundario. Una resina transportadora con las características anteriores se vende comercialmente como DUOLITE™ PWA7. En otras composiciones enzimáticas inmovilizadas más de la invención, las composiciones enzimáticas de cualquiera de las composiciones enzimáticas inmovilizadas descritas en el presente documento, para uso en procesos que convierten almidones y derivados de almidón y sacáridos en monosacáridos de hexosa, incluidos procesos para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol, se inmovilizan en una resina de afinidad de etiqueta His; que puede o no estar compuesto por un transportador de material de partículas CPG o CPG híbrido; y que pueden, o no, quelar hierro o zinc. Una resina transportadora con las características anteriores se vende comercialmente como EziG™ Opal.

[0026] En general, el peso total de las enzimas en una composición enzimática inmovilizada de la invención, en relación con el peso del transportador %(p/p), oscila entre 2,5 % y 12,5 %. Por lo tanto, el peso total de las composiciones enzimáticas de cualquiera de las composiciones enzimáticas inmovilizadas descritas en el presente documento, para uso en procesos que convierten almidones y derivados de almidón y sacáridos en monosacáridos de hexosa, incluidos

procesos para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol, en relación con el peso del transportador $\%$ (p/p), puede ser aproximadamente 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 %, 11 %, 11,5 %, 12 %, 12,5 % o cualquier % p/p en esto. Por ejemplo, el peso total de las enzimas (α GP, PGM, PGI, F6PE y T6PP) o (α GP, 4GT, PGM, PGI, F6PE y T6PP) en algunas composiciones de enzimas inmovilizadas utilizadas para producir tagatosa es del 5 %. mientras que en el peso total de las enzimas (α GP, PGM, PGI, P6PE y P6PP) o (α GP, 4GT, PGM, PGI, P6PE y P6PP) es de 6.5%.

[0027] La invención también se refiere a un proceso enzimático para preparar una hexosa a partir de un sacárido que comprende el paso de poner en contacto un derivado de almidón con una composición enzimática inmovilizada de la invención en condiciones de reacción adecuadas para convertir el derivado de almidón en hexosa. En un proceso enzimático de la invención para preparar una hexosa, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete u al menos ocho enzimas de un proceso pueden inmovilizarse en el mismo transportador, o inmovilizarse en múltiples transportadores. Por ejemplo, en un proceso enzimático de la invención, las enzimas pueden inmovilizarse en el mismo transportador, o las enzimas inmovilizadas pueden distribuirse entre al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete, o al menos ocho transportadores, que pueden ser el mismo tipo de transportador, o cualquier combinación de diferentes transportadores y métodos de inmovilización, incluidos transportadores de resinas de intercambio aniónico de base débil, transportadores de policondensado de fenol formaldehído, transportadores que comprenden un grupo funcional de amina terciaria, (ej., DUOLITE™ A568), transportadores que comprenden grupos funcionales de amina secundaria (ej., DUOLITE™ PWA7), transportadores que comprenden una resina de afinidad de etiqueta His, transportadores que comprenden partículas de vidrio de poro controlado (CPG) y transportadores funcionalizados por un metal quelado, incluidos los transportadores en los que el metal quelado es hierro o zinc (ej., EziG™ Opal).

[0028] Se conocen en la técnica métodos para inmovilizar enzimas en cualquiera de los transportadores descritos aquí, incluido el tampón apropiado y las condiciones de reacción para unir enzimas a resinas transportadoras. Ver, por ejemplo, WO 2016/160573, que se incorpora aquí en su totalidad

[0029] Los procesos para convertir almidones y derivados de almidón y sacáridos en hexosas usando composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención se pueden realizar bajo los

mismos parámetros de temperatura, tampón y tiempo de reacción usados para la producción de hexosas usando enzimas no inmovilizadas en solución. Por ejemplo, las composiciones enzimáticas inmovilizadas de la invención se pueden usar para producir tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa o inositol a partir de almidones y derivados del almidón y sacáridos en las condiciones de reacción descritas en las solicitudes PCT publicadas WO 2018/169957, WO 2017/059278 y WO 2018/112139. Los pasos de reacción de catalización múltiple en un proceso de producción de una hexosa utilizando una composición enzimática inmovilizada de la invención se pueden realizar en un solo biorreactor, o en una pluralidad de biorreactores dispuestos en serie, o en un recipiente de reacción. Alternativamente, los pasos también pueden llevarse a cabo en una pluralidad de biorreactores, o recipientes de reacción, que están dispuestos en serie o en paralelo. Todos los procesos antes mencionados se pueden ejecutar en modo por lotes o en modo continuo. Se prefiere un proceso de "recipiente único" en un solo biorreactor.

[0030] Los pasos en un proceso enzimático de la invención pueden llevarse a cabo a una temperatura que oscila entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 90 °C, aproximadamente 40° C y aproximadamente 70° C, aproximadamente 50° C y aproximadamente 60 °C o aproximadamente 55° C y a un pH que oscila entre 5,0 y 8,0, entre 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,5. Pueden llevarse a cabo durante alrededor de 0,5 horas a alrededor de 48 horas, alrededor de 4 horas a 24 horas o alrededor de 8 horas a 12 horas. Las etapas del proceso enzimático de la invención se pueden realizar sin ATP y/o sin NAD(P)(H). Los pasos se pueden llevar a cabo a una concentración de fosfato que oscila entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 150 mM. El fosfato utilizado en las etapas de fosforilación y desfosforilación de los procesos según la invención puede reciclarse dentro de la reacción enzimática en cascada. Los procesos de la invención se pueden llevar a cabo en una columna empaquetada o en una suspensión.

[0031] Por ejemplo, las concentraciones de fosfato de reacción en cada uno de los procesos pueden variar desde aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 300 mM, desde aproximadamente 0 mM hasta aproximadamente 150 mM, desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, preferiblemente desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 50 mM, o más preferiblemente desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM. Por ejemplo, la concentración de fosfato de reacción en cada uno de los procesos puede ser de aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM,

aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM o aproximadamente 55 mM.

[0032] La baja concentración de fosfato da como resultado una disminución de los costos de producción debido al bajo contenido total de fosfato y, por lo tanto, un menor costo de eliminación de fosfato. También previene la inhibición de enzimas de proceso por altas concentraciones de fosfato libre y disminuye el potencial de contaminación por fosfato.

[0033] Además, cada uno de los procesos descritos en el presente documento se puede realizar sin ATP añadido como fuente de fosfato, es decir, libre de ATP. Cada uno de los procesos también se puede realizar sin tener que añadir NAD(P)(H), es decir, libre de NAD(P)(H). Otras ventajas también incluyen el hecho de que al menos un paso de los procesos divulgados para producir una hexosa implica una reacción química energéticamente muy favorable que es esencial para altos rendimientos. Una reacción química altamente energéticamente favorable para un proceso de la invención tiene una constante de equilibrio (K_{eq}) de al menos 2, al menos 3 o al menos 4.

[0034] Como primer paso en un proceso de la invención, los derivados de almidón pueden prepararse por hidrólisis enzimática de almidón o por hidrólisis ácida de almidón. Ver, por ejemplo, WO 2017/059278. Por ejemplo, la hidrólisis enzimática del almidón puede ser catalizada o potenciada por isoamilasa (IA, EC. 3.2.1.68), que hidroliza enlaces α -1,6-glucosídicos; pululanasa (PA, EC. 3.2.1.41), que hidroliza enlaces α -1,6-glucosídicos; 4- α -glucanotransferasa (4GT, EC. 2.4.1.25), que cataliza la transglucosilación de maltooligosacáridos cortos, produciendo maltooligosacáridos más largos; o alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), que escinde los enlaces α -1,4-glucosídicos. Además, los derivados de celulosa se pueden preparar por hidrólisis enzimática de celulosa catalizada por mezclas de celulasas, por ácidos o por pretratamiento de biomasa.

Ejemplos

[0035] **Ejemplo 1.** Evaluación de transportadores de enzimas. Se evaluaron los transportadores enzimáticos en cuanto a las velocidades de reacción relativas de las composiciones enzimáticas para producir tagatosa, así como su efecto sobre la estabilidad enzimática. Con esos objetivos en mente, se evaluaron los siguientes materiales transportadores de enzimas: Cuatro resinas de matriz de fenol-formaldehído de marca (DUOLITE™ A568,

DUOLITE™ A561, DUOLITE™ PWA7, AmberLite™ FPA54); Dos resinas de poliestireno de marca (Lifetech™ ECR1640 y LifeTech™ ECR1504); Dos resinas de polimetilacrilato de marca (Lifetech™ ECR8309M y Chromolite™ D6154); y una resina de vidrio de poro controlado de marca (EziG Opal™).

[0036] La resina de intercambio iónico DUOLITE™ A568 (DuPont) es una resina de intercambio aniónico de base débil, granular y altamente porosa basada en policondensado de fenol-formaldehído reticulado. Su hidrofiliidad y distribución controlada del tamaño de los poros la convierten en la resina más adecuada para usarse como transportador de enzimas en muchas aplicaciones de bioprocesamiento. La fuerza iónica, el volumen de poro, el tamaño de poro y el tamaño de partícula de DUOLITE™ A568 están diseñados para una inmovilización óptima de las enzimas utilizadas en las industrias de almidón y grasa (y otras).

[0037] La resina de intercambio iónico DUOLITE™ A561 es un intercambiador de aniones básico débil hecho de fenol formaldehído con un grupo funcional de amina terciaria, y sus especificaciones generales son similares a las de la resina DUOLITE™ A568, pero DUOLITE™ A561 tiene una morfología de perlas diferente.

[0038] DUOLITE™ PWA7 es un intercambiador de aniones débilmente básico con funcionalidad de amina y forma de sal.

[0039] La resina de intercambio iónico AMBERLITE™ FPA54 es una resina de intercambio aniónico de base débil y altamente porosa, basada en una matriz de fenol-formaldehído reticulado. Las características de bajo hinchamiento de AMBERLITE™ FPA54 le otorgan una excelente estabilidad física y osmótica, lo que da como resultado una menor pérdida de producto y una vida útil más prolongada que las resinas estiránicas convencionales en aplicaciones de procesamiento de alimentos y bioprocesamiento. La matriz porosa fenólica hidrófila de AMBERLITE™ FPA54 permite la adsorción reversible de cuerpos de color orgánicos de alto peso molecular que se encuentran con frecuencia en soluciones de productos naturales y productos de fermentación. AMBERLITE™ FPA54 exhibe una alta selectividad para sulfatos y fosfatos y, por lo tanto, lo hace ideal para el tratamiento de ácidos cítricos y lácticos derivados de la fermentación donde tiene un largo historial de uso, particularmente debido a su excelente estabilidad osmótica.

[0040] Lifetech™ ECR1640 es un copolímero de divinilbenceno (DVB) y estireno funcionalizado con aminas cuaternarias. Se utiliza para la inmovilización de enzimas por interacción iónica de los aminoácidos de superficie ionizables (Lys, Arg, His, Asp, Glu) con las aminas terciarias del polímero. Es particularmente adecuado para la inmovilización de enzimas

con pIs en el rango de 3-5 como muchas glucosidasas. Las características principales de Lifetech™ ECR1640 son la posibilidad de regenerar la resina, el ajuste del pH antes de la inmovilización y el tamaño de partícula grande para aplicaciones de columna. DVB/estireno con aminas cuaternarias, 300-1200 micras, estabilidad de pH 1-14, humedad suministrada (66-72 % de agua), capacidad 0,85 eq/l en forma de Cl.

[0041] Lifetech™ ECR1504 es un copolímero de divinilbenceno (DVB) y estireno funcionalizado con aminas terciarias. Se utiliza para la inmovilización de enzimas por interacción iónica de los aminoácidos de superficie ionizables (Lys, Arg, His, Asp, Glu) con las aminas terciarias del polímero. Es particularmente adecuado para la inmovilización de enzimas con pI en el rango de 3-5 como muchas glucosidasas. Las características principales de Lifetech™ ECR1504 son la posibilidad de regenerar la resina, el ajuste del pH antes de la inmovilización y el tamaño de partícula grande para aplicaciones de columna. DVB/estireno con aminas terciarias, 300-1200 micras, estabilidad pH 1-14, humedad suministrada (53-62% de agua), capacidad 1,3 eq/base libre l.

[0042] Lifetech™ ECR8309M es un polímero de metacrilato hidrofílico de alta porosidad funcionalizado con grupos amino en un espaciador corto (C2).

[0043] Chromolite™ D6154 es un polimetacrilato macroporoso, es un material funcionalizado para la unión por afinidad específica para etiquetas de poliHis. El grupo funcional es iminodiacético, forma Na⁺

[0044] EziG™ Opal está hecho de partículas de vidrio de poro controlado (CPG) y tiene una superficie hidrofílica. El material tiene una distribución de tamaño de poro estrecho, producido con un diámetro de poro de ~500 Å como estándar. Se espera una carga de masa de 15 - 60% de enzima activa. Existen otras variaciones de EziG™ y se probaron (Amber y Coral), pero su rendimiento fue inferior al óptimo en comparación con Opal.

[0045] Una composición enzimática que contiene los siguientes porcentajes peso/peso (p/p) de cada una de las siguientes enzimas, respectivamente, en relación con el peso total de la enzima de la composición: 19% α -glucano fosforilasa (α GP, UNIPROT ID G8NCC0, SEQ. ID. NO. 1); 17 % de fosfoglucomutasa (PGM, UNIPROT ID A0A0P6YKY9, SEQ. ID. NO. 2); 3% de fosfoglucoisomerasa (PGI, UNIPROT ID Q5SLL6, SEQ. ID. NO. 3); 23 % de fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE, UNIPROT ID A0A0P6XN50, SEQ. ID. NO. 4); 35 % de tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP, UNIPROT ID D1C7G9, SEQ. ID. NO. 5); y 3 % de 1,4-glucano transferasa (4-GT, UNIPROT ID E8MXP8, SEQ. ID. NO. 6), se inmovilizó en cada uno de los transportadores descritos anteriormente. Todas las preparaciones de enzimas inmovilizadas

tenían un 5% de peso total de enzima/transportador. Véase, la Tabla 2. Las proporciones de enzimas anteriores se optimizaron previamente para la producción de tagatosa utilizando la metodología de inmovilización que se describe a continuación.

[0046] Tabla 2

Enzima	ID Uniprot	% de composición enzimática
α glucano fosforilasa (α GP)	G8NCC0 (SEQ. ID. NO. 1)	19%
Fosfoglucomutasa (PGM)	A0A0P6YKY9 (SEQ. ID. NO. 2)	17%
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	Q5SLL6 (SEQ. ID. NO. 3)	3%
fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE)	A0A0P6XN50 (SEQ. ID. NO. 4)	23%
tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP)	D1C7G9 (SEQ. ID. NO. 5)	35%
1,4-glucano transferasa (4-GT)	E8MXP8 (SEQ. ID. NO. 6)	3%

[0047] Antes de adherir las enzimas de la composición a cada transportador, el transportador se equilibró con dos volúmenes equivalentes de agua y luego con tres volúmenes equivalentes de tampón de inmovilización pH 7,2 (Na_2PO_4 5 mM, MgSO_4 5 mM, MnCl_2 0,25 mM). Las enzimas se suspendieron en el tampón de inmovilización para formar la composición enzimática (preferiblemente entre 5 y 10 g/l de enzima) que luego se añadió al transportador para hacer una suspensión. Durante la incubación a temperatura ambiente en un agitador orbital a 800 rpm, se midió la absorbancia de la composición enzimática y la suspensión del transportador a 280 nm para rastrear la adsorción de las enzimas al transportador hasta que >95 % de las enzimas solubles ya no estuvieran suspendidas en la solución, que fue de alrededor de 6 horas para una muestra cargada al 5% (p/p, enzimas/transportador). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el transportador inmovilizado con tampón de reacción pH 7,2 (Na_2PO_4 25 mM, Na_2SO_3 4 mM, MgSO_4 2,5 mM, MnCl_2 0,25 mM) para eliminar las enzimas solubles restantes. Cada muestra de suspensión se mezcló con un volumen igual de una solución de alimentación concentrada 2X (320 g/L de maltodextrina dextrosa equivalente 5 (DE 5) pH 7,2, Na_2PO_4 25 mM, Na_2SO_3 4 mM, MgSO_4 2,5 mM, MnCl_2 0,25 mM) para lograr una concentración final de sustrato de maltodextrina de 160 g/L en condiciones de reacción. La mezcla maltodextrina-transportador se agitó durante la noche en un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml en un Eppendorf Thermomixer F2.0 a 800-1500 rpm y a 50 ° C para DUOLITE™ A568, Lifetech™ ECR1640, LifeTech™ ECR1504, Lifetech™ ECR8309M, Chromolite™ D6154 y EziG™ Opal combinaciones composición-transportador 55 ° C para las combinaciones composición-transportador DUOLITE™ A561, DUOLITE™ PWA7, AmberLite™ FPA54. La reacción continuó durante

15-18 horas. El producto resultante se desarrolló en una columna HiPlex H Ligand Exchange (Agilent) utilizando un sistema HPLC Agilent serie 1100 con detector de índice de refracción en línea (0,6 ml/min con fase móvil H_2SO_4 5 mM a 65°C). La concentración de tagatosa se determinó comparando las áreas de los picos de la muestra con las de las soluciones estándar de tagatosa conocidas. Se calcularon las tasas de actividad en cascada de la composición enzimática inmovilizada (μmol de tagatosa producida/min/mg de enzima total) para cada transportador. Las tasas de actividad en cascada para cada preparación de composición de transportador se informan en la Tabla 1 en relación con la tasa de actividad en cascada de la preparación composición -transportador Duolite A568. La maltodextrina y la tagatosa restantes se eliminaron por lavado de cada preparación de enzima inmovilizada mediante cinco lavados, cada uno de los cuales constaba de al menos tres equivalentes en volumen de tampón de reacción para equilibrar la preparación para su reutilización. Las preparaciones de enzimas inmovilizadas se reutilizaron añadiendo solución de alimentación de maltodextrina concentrada 2X como antes. Las velocidades de reacción se calcularon con cada uso subsiguiente y se representaron gráficamente para determinar la semivida de trabajo del catalizador inmovilizado. La semivida se determinó midiendo la tasa de cascada ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) el día 0 y los días subsiguientes hasta que menos de la mitad de la actividad se perdió consistentemente (en comparación con el día 0). Una designación de n/d en la Tabla 3 indica que se encontró $<10\%$ de la semivida o que la actividad en cascada fue $<50\%$ de Duolite A568.

[0048] Tabla 3

Nombre del transportador	Material	Interacción de inmovilización enzimática con transportador	Tasa de actividad en cascada (% relativo a DUOLITE™ A568)	Semivida (% relativo a DUOLITE™ A568)
DUOLITE™ A568	fenol-formaldehído	Iónico	100.0%	100 %
DUOLITE™ A561	fenol-formaldehído	Iónico	41.3%*	n/d
DUOLITE™ PWA7	fenol-formaldehído	Iónico	92.0%	100%
ÁMBARLITE™ FPA54	fenol-formaldehído	Iónico	25.7%*	n/d
Lifetech™ ECR1640	poliestireno	Iónico	35,9 %	n/d
LifeTech™ ECR1	poliestireno	Iónico	2,2 %	n/d
Lifetech™ ECR8309M	polimetacrilato	Iónico	77,5 %	10 %

Chromolite™ D6154	polimetacrilato	Afinidad	59,4 %	10 %
EziG™ Opal	vidrio de poro controlado	Afinidad	119,6 %	30 %

* reacción de sacárido a hexosa realizada a 55 ° C

[0049] **Ejemplo 2.** *Efecto de la proporción de enzimas en la tasa de cascada.* Para evaluar el efecto de cambiar las proporciones de varias enzimas inmovilizadas en la producción de tagatosa, las cantidades de α GP, PGM, PGI, F6PE, T6PP y 4-GT inmovilizadas en DUOLITE™ A568 se variaron en relación con la composición inmovilizada en DUOLITE™ A568 que se preparó usando las proporciones de enzimas descritas en el Ejemplo 1 y la Tabla 1 (“la composición inmovilizada del Ejemplo 1”), en dos preparaciones de composición inmovilizada. Sus tasas de actividad se evaluaron frente al rendimiento de la composición inmovilizada del Ejemplo 1. En una de las composiciones inmovilizadas de concentración variada, las cantidades de enzimas se basaron en la tasa observada de cada enzima en relación con T6PP en solución, como se muestra en la Tabla 4 (Fig. 1B), donde se agregó una cantidad igual de actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$) para cada enzima. La tasa de actividad de esta composición inmovilizada fue del 74% de la relación óptima. La otra composición inmovilizada de concentración variada contenía cantidades iguales de cada enzima en peso (Fig. 1C). La tasa de actividad de esta composición inmovilizada fue del 85% de la relación óptima. Las reacciones se llevaron a cabo y las tasas de conversión se midieron en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de enzimas totales como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 4

Enzima	Actividad enzimática como % de actividad T6PP
α glucano fosforilasa (α GP)	78 %
Fosfoglucomutasa (PGM)	861 %
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	2930 %
fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE)	215 %
tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP)	100 %
1,4-glucano transferasa (4-GT)	977 %

[0050] **Ejemplo 3:** *Efecto de la distribución de enzimas en uno o más transportadores.* El proceso de producción de tagatosa a partir de maltodextrina usando una composición inmovilizada con DUOLITE™ A568 preparada en una sola reacción de inmovilización como se describe en el Ejemplo 1 (19 % α GP, 17 % PGM, 3 % PGI, 23 % F6PE, 35 % T6PP y 3 % 4-GT), se comparó con las tasas de actividad de los procesos realizados utilizando: (1) Una mezcla

de una composición inmovilizada con DUOLITE™ A568 de las enzimas principales de producción (α GP, PGM, PGI y 4GT) y una composición inmovilizada con DUOLITE™ A568 de las enzimas específicas de producción de tagatosa (F6PE y T6PP); y (2) una mezcla de 6 preparaciones de enzimas inmovilizadas separadas: DUOLITE™ A568 inmovilizado α GP, DUOLITE™ A568-inmovilizado PGM, DUOLITE™ A568-inmovilizado PGI, DUOLITE™ A568-inmovilizado 4GT, DUOLITE™ A568-inmovilizado F6PE y DUOLITE™ A568-inmovilizado T6PP. Todas las enzimas en (1) y (2) estaban presentes en las mismas proporciones que en la composición inmovilizada DUOLITE™ A568 a la que se hace referencia, y todas las inmovilizaciones se realizaron utilizando una proporción del 5 % p/p (enzima/transportador) y tampones/ condiciones de reacción como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Configuración de co-inmovilización	Tasa de actividad relativa
α GP + PGM + PGI + 4GT + F6PE + 4GT composición inmovilizada	100 %
Combinación de composición inmovilizada α GP + PGM + PGI + 4GT y composición inmovilizada F6PE + T6PP	85,1 %
Combinación de α GP + PGM + PGI + 4GT + F6PE + 4GT + F6PE + T6PP inmovilizado separadamente	27,2 %

[0051] Ejemplo 4. Efecto de la carga enzimática. Se inmovilizaron enzimas a diferentes cargas (g de enzimas/g de transportador que oscilan entre 2,5 % y 12,5 % en intervalos de 2,5 %) en Duolite A568 como se describe en el Ejemplo 1 y en las proporciones enumeradas en la Tabla 2. Sin embargo, a diferencia del Ejemplo 1, se permitió que continuaran las inmovilizaciones durante 16 horas para cada muestra en lugar de 6 horas para dar tiempo a que la unión de las enzimas llegara a completarse para las cargas más altas. Las enzimas solubles se eliminaron con cinco lavados que contenían al menos tres volúmenes de muestra de tampón de reacción pH 7,2 (Na_2PO_4 25 mM, Na_2SO_3 4 mM, MgSO_4 2,5 mM, MnCl_2 0,25 mM). Las muestras se hicieron reaccionar con solución de alimentación de maltodextrina durante 16 horas y las tasas de conversión se midieron en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de enzimas totales como en el Ejemplo 1. Las tasas de cascada enzimática relativas con respecto a una muestra cargada al 5 % se representan en función de la carga en la Figura 2. La respuesta de carga junto con el precio de las enzimas y el soporte permite diseñar el catalizador más rentable.

[0052] Ejemplo 5. *Preparación de alulosa utilizando una composición enzimática inmovilizada.* Se inmovilizaron en DUOLITE™ A568 composiciones enzimáticas que

contenían las siguientes enzimas, α GP, PGM, PGI, psicosa 6-fosfato 3-epimerasa (P6PE), psicosa 6-fosfato fosfatasa (P6PP) y 4-GT en tres proporciones diferentes entre las enzimas en las respectivas reacciones de inmovilización, como se describe en la Tabla 6. Se realizó un análisis comparativo de las tres preparaciones de composición inmovilizadas para producir alulosa a partir de maltodextrina.

Tabla 6. Composición enzimática de la inmovilización de alulosa.

Enzima	ID Uniprot	% p/p (enzima/composición)		
		Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3
α glucano fosforilasa (α GP)	G8NCC0 (SEQ. ID. NO. 1)	20%	20 %	20 %
Fosfoglucomutasa (PGM)	A0A0P6YKY9 (SEQ. ID. NO. 2)	16,5%	16,5 %	16,5 %
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	Q5SLL6 (SEQ. ID. NO. 3)	3%	3 %	3 %
psicosa 6-fosfato 3-epimerasa (P6PE)	A0A223HZI7 (SEQ. ID. NO. 7)	3%	7 %	14 %
psicosa 6-fosfato fosfatasa (P6PP)	A0A0E3NCH4 (SEQ. ID. NO. 8)	54%	50 %	43 %
1,4-glucano transferasa (4-GT)	D7BF07 (SEQ. ID. NO. 6)	3%	3 %	3 %

[0053] Para preparar los cócteles inmovilizados, se pretrató DUOLITE™ A568 con una solución acuosa de glutaraldehído (GA) al 1 % durante 2 horas a temperatura ambiente en un rotador de extremo a extremo. El GA se eliminó lavando 5x con agua y 2x lavados acondicionadores con tampón de inmovilización (tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, MgSO_4 5 mM y CoCl_2 80 μM). Luego se agregaron soluciones de enzimas (Tabla 5) al transportador pretratado con GA después del paso de lavado final (el sobrenadante se descartó). Las soluciones de enzima consistían en 5 g/l de enzima en tampón de reacción (tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, MgSO_4 5 mM, NaSO_3 5 mM y CoCl_2 80 μM). Las soluciones de enzima más transportador se incubaron a temperatura ambiente durante 16 horas en un agitador orbital ajustado a 800 rpm para inmovilizar las mezclas de enzimas en el transportador. El porcentaje total de carga fue del 6,5% (mg de enzima por mg de transportador). El sobrenadante se lavó con seis lavados que consistían en tampón de reacción para eliminar cualquier resto de enzimas no unidas. Se eliminó el sobrenadante final y se agregaron 150 g/L de maltodextrina, previamente disuelta en tampón de reacción. La mezcla maltodextrina-transportador se agitó durante la noche (15-16 horas) en un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml en un Eppendorf Thermomixer F2.0 a 800 - 1500 rpm y 55 °C. El producto resultante se desarrolló

en una columna SupelCogel Pb (Sigma Aldrich) utilizando un sistema HPLC Agilent serie 1100 con detector de índice de refracción en línea (0,6 ml/min con fase móvil de agua ultrapura a 80 ° C). Las concentraciones de alulosa se determinaron al comparar las áreas de los picos de la muestra con las de las soluciones estándar de alulosa conocidas, y se calcularon las tasas de actividad específica de cascada enzimática. La reacción de producción de alulosa se eliminó por lavado de cada preparación de inmovilización con 4 lavados de tampón de reacción para equilibrar la preparación inmovilizada para su reutilización. Los resultados de las actividades específicas relativas de cada composición de muestra se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividades relativas de las enzimas de producción de alulosa inmovilizadas

Composiciones de alulosa inmovilizada	Actividad específica relativa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de enzima)
Preparación 1	100 %
Preparación 2	77,7 %
Preparación 3	51,1 %

[0054] **Ejemplo 6.** *Preparación de alosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La alosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye αGP , PGM, PGI, 4GT y P6PE, A6PI y A6PP.

[0055] **Ejemplo 7.** *Preparación de fructosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La fructosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye αGP , PGM, PGI, 4GT y F6PP.

[0056] **Ejemplo 8.** *Preparación de manosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La fructosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye αGP , PGM, PGI, 4GT y M6PI o PGPMI y M6PP.

[0057] **Ejemplo 9.** *Preparación de galactosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La galactosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye αGP , PGM, PGI, F6PE, 4GT, Gal6PI y Gal6P.

[0058] **Ejemplo 10.** *Preparación de altrosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La altrosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, PGI, P6PE, Alt6PI y Alt6PP.

[0059] **Ejemplo 11.** *Preparación de talosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La talosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, PGI, F6PE, Tal6PI y Tal6PP.

[0060] **Ejemplo 12.** *Preparación de sorbosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La sorbosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, PGI, F6PE, S6PE y S6PP.

[0061] **Ejemplo 13.** *Preparación de gulosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La gulosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, PGI, F6PE, S6PE, Gul6PI y Gul6PP.

[0062] **Ejemplo 15.** *Preparación de idosa a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* La idosa se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, PGI, F6PE, S6PE, I6PI e I6PP.

[0063] **Ejemplo 16.** *Preparación de inositol a partir de maltodextrina utilizando una composición enzimática inmovilizada.* El inositol se producirá a partir de maltodextrina utilizando una composición de enzimas inmovilizadas que incluye α GP, PGM, 4GT, IPS e IMP.

REIVINDICACIONES

1. Una composición enzimática inmovilizada para la preparación de una hexosa que comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis transportadores, al menos siete u al menos ocho de las siguientes enzimas inmovilizadas en al menos un transportador o una mezcla de transportadores:

- a) α glucano fosforilasa (α GP), fosfoglucomutasa (PGM), y opcionalmente 1,4-glucano transferasa (4-GT); y
- b) una enzima dentro de una combinación de enzimas seleccionadas de:
 - (i) fosfoglucoisomerasa (PGI), fructosa-6-fosfato epimerasa (F6PE) y tagatosa-6-fosfato fosfatasa (T6PP) para preparar tagatosa;
 - (ii) fosfoglucoisomerasa (PGI), piscosa-6-fosfato epimerasa (P6PE) y pícica-6-fosfato fosfatasa (P6PP) para preparar alulosa;
 - (iii) fosfoglucoisomerasa (PGI), P6PE, alosa-6-fosfato isomerasa (A6PI) y alosa-6-fosfato fosfatasa (A6PP) para preparar alosa;
 - (iv) fosfoglucoisomerasa (PGI), manosa-6-fosfato isomerasa (M6PI) o fosfoglucosa/fosfomanosa isomerasa (PGPMI) y manosa 6-fosfato fosfatasa (M6PP) para preparar manosa;
 - (v) fosfoglucoisomerasa (PGI), F6PE, galactosa 6-fosfato isomerasa (Gal6PI) y galactosa 6-fosfato fosfatasa (Gal6PP) para preparar galactosa;
 - (vi) PGI y fructosa 6-fosfato fosfatasa (F6PP) para preparar fructosa;
 - (vii) PGI, P6PE, altrosa 6-fosfato isomerasa (Alt6PI) y altrosa 6-fosfato fosfatasa (Alt6PP) para preparar altrosa;
 - (viii) PGI, F6PE, talosa 6-fosfato isomerasa (Tal6PI) y talosa 6-fosfato fosfatasa (Tal6PP) para preparar talosa;
 - (ix) PGI, F6PE, sorbosa 6-fosfato epimerasa (S6PE) y sorbosa 6-fosfato fosfatasa (S6PP) para preparar sorbosa;
 - (x) PGI, F6PE, S6PE, gulosa 6-fosfato isomerasa (Gul6PI) y gulosa 6-fosfato fosfatasa (Gul6PP) para preparar gulosa;
 - (xi) PGI, F6PE, S6PE, idosa 6-fosfato isomerasa (I6PI) e idosa 6-fosfato fosfatasa (I6PP) para preparar idosa; y
 - (xii) inositol 3-fosfato sintasa (IPS) e inositol monofosfatasa (IMP) para preparar inositol.

2. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 1, en donde el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) oscila entre 0,1% y 40%.
3. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 1 o 2, que comprende 10-30% (α GP); 0-10% (4GT); 10-30% (PGM); y cuando está presente 0.1-10% (IGP).
4. La composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 3, que además comprende PGI, F6PE y T6PP para preparar tagatosa.
5. La composición de enzimas inmovilizadas de la reivindicación 4, en donde el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) es: 10-30% (α GP); 0-10% (4GT); 10-30% (PGM); 0,1-10% (IGP); 15-35% (F6PE); y T6PP (25-45%), en donde el peso total de enzimas en la composición totaliza 100 % p/p con respecto al peso total de las enzimas.
6. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 5, en donde
la α GP comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 1;
la 4-GT comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 6;
la PGM comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 2;
la PGI comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 3
la F6PE comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 4; y
la T6PP comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 5.
7. La composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 3, que además comprende PGI, P6PE y P6PP para preparar alulosa.

8. La composición de enzimas inmovilizadas de la reivindicación 7, en donde el peso de cada enzima en relación con el peso total de las enzimas %(p/p) es: 10-30% (α GP); 0-10% (4GT); 10-30% (PGM); 0,1-10% (IGP); 0,1-10% (P6PE); y (45-65 %) P6PP, en donde el peso total de enzimas en la composición totaliza 100 % p/p con respecto al peso total de las enzimas.
9. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 8, en donde:
- la α GP comprende la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma, de la SEQ ID NO. 1;
 - la 4-GT comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6;
 - la PGM comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2;
 - la PGI comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 3
 - la P6PE comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7; y
 - la P6PP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8.
10. La composición de enzimas inmovilizadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el peso total de las enzimas en relación con el peso del transportador %(p/p) es del 2,5% al 12,5%.
11. La composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el transportador es una resina de intercambio aniónico de base débil.
12. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 11, en donde el transportador comprende un policondensado de fenol formaldehído.
13. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 11 o 12, en donde el transportador comprende un grupo funcional de amina terciaria, en donde la composición es, opcionalmente, DUOLITE™ A568.
14. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 11 o 12, en donde el transportador comprende un grupo funcional de amina secundaria, en donde la composición es, opcionalmente, DUOLITE™ PWA7.

15. La composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el transportador comprende una resina de afinidad de etiqueta His.
16. La composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 15, en donde el transportador comprende partículas de vidrio de poro controlado (CPG).
17. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 15 o 16, en donde el transportador está funcionalizado por un metal quelado.
18. La composición enzimática inmovilizada de la reivindicación 18, en donde el metal quelado es hierro o zinc o en donde el transportador es, opcionalmente, EziG™ Opal.
19. Un proceso enzimático para preparar una hexosa a partir de un sacárido que comprende el paso de poner en contacto un derivado de almidón con una composición enzimática inmovilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 en condiciones de reacción adecuadas para convertir el derivado de almidón en hexosa.
20. El proceso de la reivindicación 19, en donde los pasos del proceso se llevan a cabo a una temperatura que oscila entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 85 °C, a un pH que oscila entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 y/o durante aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 48 horas.
21. El proceso de la reivindicación 19 o 20, en donde los pasos del proceso se llevan a cabo en un solo biorreactor, una pluralidad de biorreactores dispuestos en serie o una pluralidad de biorreactores dispuestos en paralelo.
22. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde los pasos del proceso se llevan a cabo sin ATP, sin NAD(P)(H), a una concentración de fosfato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 150 mM, el fosfato se recicla dentro de la reacción enzimática en cascada, y/o al menos un paso del proceso implica una reacción química energéticamente favorable.

Resumen

La invención se refiere a composiciones de enzimas inmovilizadas para la preparación de una hexosa. Las hexosas incluyen, por ejemplo, tagatosa, psicosa, fructosa, alosa, manosa, galactosa, altrosa, talosa, sorbosa, gulosa, idosa e inositol. La invención también se refiere a un proceso enzimático para preparar una hexosa a partir de un sacárido poniendo en contacto un derivado de almidón con una composición enzimática inmovilizada de la invención.