



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033773

(51)⁷ C12N 9/90; C12P 19/24

(13) B

(21) 1-2018-01774

(22) 30/09/2016

(86) PCT/US2016/054838 30/09/2016

(87) WO/2017/059278 06/04/2017

(30) 62/236,226 02/10/2015 US

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/07/2018 364A

(73) BONUMOSE INC. (US)

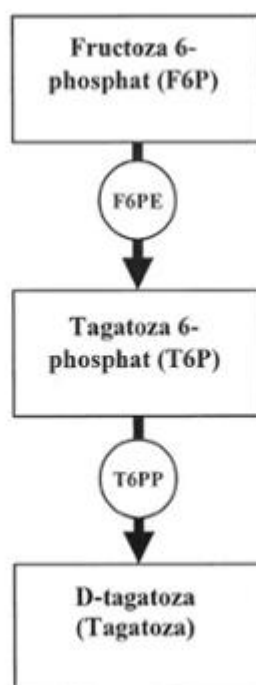
1725 Discovery Drive Suite 220 Charlottesville, VA 22911, United States of America

(72) WICHELECKI, Daniel, Joseph (US).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT TAGATOZA BẰNG ENZYM

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất tagatoza bằng enzym, trong đó quy trình này bao gồm các bước chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành tagatoza 6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE), và chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza được xúc tác bởi tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất đường D-tagatoza. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất D-tagatoza bằng cách chuyển hóa fructoza-6-phosphat (F6P) thành tagatoza-6-phosphat (T6P) bằng enzym, và chuyển hóa T6P thành D-tagatoza, trong đó các bước được tiến hành trong một bình phản ứng, và trong đó các bước của quy trình không cần ATP.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

D-tagatoza (sau đây gọi là tagatoza) là một chất làm ngọt tự nhiên có hàm lượng calo thấp có độ ngọt bằng 92% độ ngọt của sucroza, song chỉ có 38% hàm lượng calo. Chất này là một hexoza monosacarit có nguồn gốc trong tự nhiên có mặt với lượng rất nhỏ trong hoa quả, cacao, và các sản phẩm bơ sữa. Tagatoza đã được phê chuẩn làm chất phụ gia thực phẩm bởi Cục quản lý dược và thực phẩm (Food and Drug Administration-FDA) vào năm 2003, điều này chứng tỏ là chất này nói chung được coi là an toàn (generally recognized as safe-GRAS). Tuy nhiên, do giá bán của tagatoza cao, nên việc sử dụng hợp chất này làm chất làm ngọt còn bị hạn chế. Tagatoza đem lại lợi ích sức khỏe gấp vạn lần: không gây sâu răng; hàm lượng calo thấp; có chỉ số đường huyết rất thấp bằng 3; làm giảm chỉ số đường huyết của glucoza 20%; làm giảm lượng glucoza trong máu trung bình; giúp ngăn ngừa bệnh tim mạch, đột quy, và các bệnh mạch máu khác bằng cách làm tăng lượng cholesterol lipoprotein mật độ cao (high-density lipoprotein-HDL); và là chất chống oxy hóa và prebiotic đã được xác minh. Lu et al., Tagatoza, a New Antidiabetic and Obesity Control Drug, Diabetes Obes. Metab. 10(2): 109-34 (2008). Vì thế, tagatoza rõ ràng có nhiều ứng dụng trong các ngành dược, công nghệ sinh, học thuật, thực phẩm, đồ uống, thực phẩm bổ sung, và tạp phẩm.

Gần đây tagatoza được sản xuất chủ yếu bằng cách thủy phân lactoza nhờ thủy phân bằng lactaza hoặc axit để tạo thành D-glucoza và D-galactoza (công bố đơn quốc tế số WO 2011150556, đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN 103025894, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 5002612, US 6057135, và US 8802843). Sau đó, D-galactoza được đồng phân hóa thành D-tagatoza bằng phương pháp hóa học nhờ canxi hydroxit trong các

điều kiện kiềm hoặc bằng enzym nhờ L-arabinoza isomeraza trong các điều kiện pH trung tính. Sản phẩm cuối được tách ra bằng cách kết hợp lọc và sắc ký trao đổi. Quy trình này được thực hiện trong một vài thùng hoặc bình phản ứng sinh học. Nói chung, phương pháp này có hạn chế vì việc tách các đường khác đòi hỏi chi phí cao (ví dụ, D-glucosa, D-galactosa, và lactosa chưa được thủy phân) và hiệu suất sản phẩm thấp. Một vài phương pháp nhờ lên men tế bào vi sinh vật đang được phát triển, nhưng chưa có phương pháp nào được chứng minh là phương pháp thay thế trong thực tế do còn phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu gốc có chi phí cao (ví dụ, galactitol và D-psicoza), hiệu suất sản phẩm thấp, và quá trình tách đòi hỏi chi phí cao.

Vẫn còn nhu cầu phát triển con đường tổng hợp có hiệu quả về mặt kinh tế để sản xuất tagatoza với hiệu suất cao, trong đó ít nhất là một bước của quy trình có liên quan đến phản ứng hóa học có lợi về mặt năng lượng. Hơn nữa, vẫn còn nhu cầu về quy trình sản xuất tagatoza, trong đó các bước của quy trình có thể được tiến hành trong một thùng hoặc bình phản ứng sinh học. Cũng vẫn còn nhu cầu về quy trình sản xuất tagatoza có thể được tiến hành ở nồng độ phosphat tương đối thấp, trong đó phosphat có thể được tái tuần hoàn, và/hoặc quy trình này không cần sử dụng adenosin triphosphat (ATP) làm nguồn phosphat. Cũng vẫn còn nhu cầu về con đường sản xuất tagatoza không cần sử dụng coenzym nicotinamid adenosin dinucleotit (NAD(H)) có chi phí cao trong bước phản ứng bất kỳ.

Patent Hàn Quốc số KR101480422 (B1) mô tả quy trình sản xuất tagatoza từ fructoza thông qua con đường fructoza-6-phosphat và tagatoza-6-phosphat, có sử dụng ATP.

Công bố đơn Canada số CA 2 912 540 (CJ CHEILJEDANG), 2014, bộc lộ phương pháp sản xuất tagatoza, trong đó fructoza được chuyển hóa thành tagatoza nhờ ketohexoza C4-epimeraza.

Tài liệu của Bosshart và các đồng tác giả, ChemBioChem; 2015, pp. 592-601, bộc lộ quy trình chuyển hóa sorboza thành tagatoza bằng epimeraza từ *Pseudomonas cichorii*.

Tài liệu của Xu và các đồng tác giả, Biochemical Engineering Journal; December 2015, pp. 28-34, mô tả quy trình đồng phân hóa galactosa thành tagatoza.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các quy trình sản xuất tagatoza. Theo nhiều khía cạnh, các quy trình này bao gồm chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành tagatoza 6-phosphat (T6P), được xúc tác bởi epimeraza; và chuyển hóa T6P thành tagatoza, được xúc tác bởi phosphataza, trong đó các bước của quy trình được tiến hành trong một bình phản ứng và trong đó các bước của quy trình không cần ATP.

Theo một vài khía cạnh của sáng chế, quy trình sản xuất tagatoza cũng bao gồm bước chuyển hóa glucoza 6-phosphat (G6P) thành F6P, trong đó bước này được xúc tác bởi phosphoglucoza isomeraza (PGI). Theo các khía cạnh khác, quy trình tổng hợp tagatoza cũng bao gồm bước chuyển hóa glucoza 1-phosphat (G1P) thành G6P, và bước chuyển hóa này được xúc tác bởi phosphoglucomutaza (PGM).

Theo một vài khía cạnh, quy trình sản xuất tagatoza có thể bao gồm chuyển hóa sacarit thành G1P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym; chuyển hóa G1P thành G6P, được xúc tác bởi phosphoglucomutaza (PGM); chuyển hóa G6P thành F6P, được xúc tác bởi phosphoglucoza isomeraza (PGI); chuyển hóa F6P thành tagatoza 6-phosphat (T6P), được xúc tác bởi epimeraza; và chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza, được xúc tác bởi phosphataza.

Các sacarit được sử dụng trong quy trình bất kỳ trong số các quy trình này có thể được chọn từ nhóm bao gồm tinh bột hoặc dẫn xuất của nó, xenluloza hoặc dẫn xuất của nó, và sucroza. Tinh bột hoặc dẫn xuất của nó có thể là amyloza, amylopectin, tinh bột hòa tan, amyloextrin, maltodextrin, maltoza, hoặc glucoza. Theo một vài khía cạnh của sáng chế, quy trình sản xuất tagatoza bao gồm chuyển hóa tinh bột thành dẫn xuất tinh bột nhờ thủy phân bằng enzym hoặc nhờ thủy phân tinh bột bằng axit. Theo các khía cạnh khác, dẫn xuất tinh bột có thể được tạo ra bằng cách thủy phân tinh bột bằng enzym được xúc tác bởi isoamylaza, pullulanaza, alpha-amylaza, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều enzym trong số các enzym này. Theo các khía cạnh nhất định, quy trình sản xuất tagatoza cũng có thể bao gồm bổ sung 4-glucan transferaza (4GT).

Theo các khía cạnh khác, quy trình sản xuất tagatoza có thể bao gồm chuyển hóa fructoza thành F6P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym; chuyển hóa F6P thành tagatoza 6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi epimeraza; và chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza, được xúc tác bởi phosphataza. Theo các phương án khác, quy trình sản xuất tagatoza bao gồm chuyển hóa sucroza thành fructoza, được xúc tác bởi ít nhất một enzym; chuyển hóa fructoza thành F6P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym; chuyển hóa F6P thành tagatoza

6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi epimeraza; và chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza, được xúc tác bởi phosphataza.

Theo các khía cạnh khác của sáng chế, G6P được sử dụng trong quy trình sản xuất tagatoza có thể được tạo ra nhờ chuyển hóa glucoza thành G6P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym. Kết quả là, glucoza có thể được tạo ra bằng cách chuyển hóa sucroza thành glucoza, được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

Trong quy trình theo sáng chế, epimeraza được sử dụng để chuyển hóa F6P thành T6P là fructoza 6-phosphat epimeraza. Fructoza 6-phosphat epimeraza có thể được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với các trình tự SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, hoặc 10. Theo các khía cạnh khác, fructoza 6-phosphat epimeraza bao gồm trình tự axit amin có ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với các trình tự SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8, hoặc 11.

Trong quy trình theo sáng chế, phosphataza được sử dụng để chuyển hóa T6P thành tagatoza là tagatoza 6-phosphat phosphataza. Tagatoza 6-phosphat phosphataza có thể được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO.: 12, 14, hoặc 16. Theo một vài khía cạnh về quy trình này, tagatoza 6-phosphat phosphataza bao gồm trình tự axit amin có ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO.: 13, 15, hoặc 17.

Theo các khía cạnh khác, quy trình theo sáng chế được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C, ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, và/hoặc trong khoảng từ 8 giờ đến 48 giờ. Theo một vài khía cạnh, các bước của quy trình sản xuất tagatoza được tiến hành trong một bình phản ứng sinh học. Theo các khía cạnh khác, các bước được tiến hành trong nhiều bình phản ứng sinh học được bố trí nối tiếp.

Theo các khía cạnh khác của sáng chế, các bước của quy trình sản xuất tagatoza được tiến hành không cần NAD(H), ở nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 0mM đến

150mM, phosphat được tái tuần hoàn, và/hoặc ít nhất là một bước của quy trình bao gồm phản ứng hóa học có lợi về mặt năng lượng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Các hình vẽ này minh họa các khía cạnh nhất định của một vài phương án theo sáng chế, và không được sử dụng nhằm làm giới hạn hoặc xác định sáng chế.

FIG.1 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym fructoza 6-phosphat thành tagatoza 6-phosphat và sau đó thành D-tagatoza (tagatoza).

FIG.2 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym tinh bột hoặc các sản phẩm dẫn xuất của nó thành tagatoza. Các thuật ngữ viết tắt dưới đây được sử dụng: α GP, alpha-glucan phosphorylaza hoặc phosphorylaza tinh bột; PGM, phosphoglucomutaza; PGI, phosphoglucoisomeraza; F6PE, fructoza 6-phosphat epimeraza; T6PP, tagatoza 6-phosphat phosphataza; IA, isoamylaza; PA, pullulanaza; MP, maltoza phosphorylaza; PPGK, polyphosphat glucokinaza.

FIG.3 thể hiện con đường chuyển hóa bằng enzym xenluloza hoặc các sản phẩm dẫn xuất của nó thành tagatoza. CDP, xenlodextrin phosphorylaza; CBP, xenlobioza phosphorylaza; PPGK, polyphosphat glucokinaza; PGM, phosphoglucomutaza; PGI, phosphoglucoisomeraza; F6PE, fructoza 6-phosphat epimeraza; T6PP, tagatoza 6-phosphat phosphataza.

FIG.4 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym fructoza thành tagatoza. PPFK, polyphosphat fructokinaza; F6PE, fructoza 6-phosphat epimeraza; T6PP, tagatoza 6-phosphat phosphataza.

FIG.5 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym glucoza thành tagatoza. PPGK, polyphosphat glucokinaza; PGI, phosphoglucoisomeraza; F6PE, fructoza 6-phosphat epimeraza; T6PP, tagatoza 6-phosphat phosphataza.

FIG.6 thể hiện con đường chuyển hóa bằng enzym sucroza hoặc các sản phẩm dẫn xuất của nó thành tagatoza. SP, sucroza phosphorylaza; PPFK, polyphosphat fructokinaza; PGM, phosphoglucomutaza; PGI, phosphoglucoisomeraza; F6PE, fructoza 6-phosphat epimeraza; T6PP, tagatoza 6-phosphat phosphataza.

FIG.7 thể hiện mức năng lượng Gibbs phản ứng giữa các chất trung gian dựa trên sự tạo thành năng lượng Gibbs để chuyển hóa glucoza 1-phosphat thành tagatoza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các con đường enzym, hoặc các quy trình, để tổng hợp tagatoza với hiệu suất sản phẩm cao, trong khi đó làm giảm đáng kể chi phí tách sản phẩm và chi phí sản xuất tagatoza.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất tagatoza, trong đó quy trình này bao gồm chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành tagatoza 6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi epimeraza và chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza được xúc tác bởi phosphataza (ví dụ, tagatoza 6-phosphat phosphataza, T6PP). Quy trình này nói chung được thể hiện trong FIG.1. Epimeraza xúc tác sự chuyển hóa F6P thành T6P là fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE).

Theo một vài khía cạnh của sáng chế, epimeraza thích hợp để sử dụng trong các quy trình chuyển hóa F6P thành T6P bao gồm trình tự axit amin có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, hoặc 11 (được thể hiện dưới đây), ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Các epimeraza thích hợp được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, hoặc 10 (được thể hiện dưới đây), ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Sáng chế cũng đề cập đến epimeraza mà bao gồm trình tự axit amin có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, hoặc 11, ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến epimeraza được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, hoặc 10, ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%,

thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Phosphataza mà chuyển hóa T6P thành tagatoza (D-tagatoza) có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế. Theo một vài khía cạnh của sáng chế, phosphataza mà có thể được sử dụng để chuyển hóa T6P thành tagatoza (D-tagatoza) bao gồm trình tự axit amin có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 12, 14, hoặc 16 (được thể hiện dưới đây), ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Tagatoza phosphataza được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 13, 15, hoặc 17 (được thể hiện dưới đây), ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Sáng chế cũng đề cập đến phosphataza mà chuyển hóa T6P thành tagatoza (D-tagatoza) và bao gồm trình tự axit amin có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 12, 14, hoặc 16, ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phosphataza mà chuyển hóa T6P thành tagatoza (D-tagatoza) và được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 13, 15, hoặc 17, ít nhất là 60%, tốt hơn ít nhất là 65%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, tốt hơn nữa ít nhất là 75%, tốt hơn nữa ít nhất là 80%, tốt hơn nữa ít nhất là 85%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là 90%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Theo một vài phương án, quy trình sản xuất tagatoza theo sáng chế cũng bao gồm bước chuyển hóa bằng enzym glucoza 6-phosphat (G6P) thành F6P, và bước này được xúc tác bởi phosphoglucoza isomeraza (PGI). Theo các phương án khác, quy trình sản xuất tagatoza còn bao gồm bước chuyển hóa glucoza 1-phosphat (G1P) thành G6P, trong đó bước này được xúc tác bởi phosphoglucomutaza (PGM). Theo các phương án khác

nữa, quy trình sản xuất tagatoza cũng bao gồm bước chuyển hóa sacarit thành G1P được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

Do đó, quy trình sản xuất tagatoza theo sáng chế có thể, ví dụ, bao gồm các bước sau: (i) chuyển hóa sacarit thành glucoza 1-phosphat (G1P) nhờ một hoặc nhiều enzym; (ii) chuyển hóa G1P thành G6P nhờ phosphoglucomutaza (PGM, EC 5.4.2.2); (iii) chuyển hóa G6P thành F6P nhờ phosphoglucoisomeraza (PGI, EC 5.3.1.9); (iv) chuyển hóa F6P thành T6P nhờ fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE), và (v) chuyển hóa T6P thành tagatoza nhờ tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP). Một ví dụ về quy trình trong đó sacarit là tinh bột được thể hiện trong FIG.2.

Thông thường, tỷ lệ của các đơn vị enzym được sử dụng trong quy trình được mô tả là 1:1:1:1:1 (α GP:PGM:PGI:F6PE:T6PP). Để tối ưu hóa hiệu suất sản phẩm, các tỷ lệ này có thể được điều chỉnh trong một số tổ hợp bất kỳ. Ví dụ, tỷ lệ 3:1:1:1:1 có thể được sử dụng để làm tăng tối đa nồng độ của các chất trung gian được phosphoryl hóa, mà sẽ làm tăng hoạt tính của các phản ứng xuôi. Ngược lại, tỷ lệ 1:1:1:1:3 có thể được sử dụng để duy trì việc cấp mạnh phosphat cho α GP, tỷ lệ này sẽ giúp phân cắt các liên kết alpha-1,4-glycozit nhờ quá trình phosphoryl phân một cách hiệu quả hơn. Tỷ lệ các enzym, ví dụ, 3:1:1:1:3 có thể được sử dụng để làm tăng thêm tốc độ phản ứng. Do đó, các tỷ lệ enzym, bao gồm các enzym tùy ý khác được mô tả dưới đây, có thể được thay đổi để làm tăng hiệu quả của quy trình sản xuất tagatoza. Ví dụ, enzym cụ thể có thể có mặt với lượng gấp 2, 3, 4, 5 lần, v.v. so với lượng của các enzym khác.

Một trong số các ưu điểm quan trọng của các quy trình sản xuất này là ở chỗ các bước của quy trình có thể được tiến hành trong một bình phản ứng sinh học hoặc bình phản ứng. Theo cách khác, các bước cũng có thể được tiến hành trong nhiều bình phản ứng sinh học, hoặc các bình phản ứng được bố trí nối tiếp.

Các ion phosphat được tạo ra bởi quá trình loại phosphat T6PP của T6P sau đó có thể được tái tuần hoàn trong bước chuyển hóa sacarit thành G1P của quy trình, cụ thể là nếu toàn bộ các bước của quy trình được tiến hành trong một bình phản ứng sinh học hoặc bình phản ứng. Khả năng tái tuần hoàn phosphat trong các quy trình được mô tả cho phép sử dụng lượng phosphat không tỷ lệ, lượng này giúp duy trì các nồng độ phosphat trong phản ứng thấp. Khả năng này tác động đến toàn bộ con đường và toàn bộ tốc độ của quy trình, nhưng không làm hạn chế hoạt tính của từng enzym và cho phép đạt được tổng hiệu suất của các quy trình sản xuất tagatoza.

Ví dụ, các nồng độ phosphat trong phản ứng có thể nằm trong khoảng từ 0mM đến 300mM, từ 0mM đến 150mM, từ 1mM đến 50mM, tốt hơn từ 5mM đến 50mM, hoặc tốt hơn nữa từ 10mM đến 50mM. Ví dụ, nồng độ phosphat trong phản ứng có thể là 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 1,5mM, 2mM, 2,5mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, hoặc 55mM.

Do đó, nồng độ phosphat thấp dẫn đến làm giảm chi phí sản xuất do tổng lượng phosphat thấp và do đó chi phí loại bỏ phosphat giảm. Nồng độ thấp này cũng ngăn ngừa sự ức chế T6PP do phosphat tự do có nồng độ cao và làm giảm khả năng ô nhiễm phosphat.

Hơn nữa, các quy trình theo sáng chế có thể được tiến hành mà không cần bổ sung ATP làm nguồn phosphat, tức là, không sử dụng ATP. Các quy trình này cũng có thể được tiến hành mà không cần bổ sung NAD(H), tức là, không sử dụng NAD(H). Các ưu điểm khác cũng bao gồm thực tế là ít nhất là một bước của quy trình được mô tả để sản xuất tagatoza bao gồm phản ứng hóa học có lợi về mặt năng lượng (FIG.7).

Các ví dụ về các enzym được sử dụng để chuyển hóa sacarit thành G1P bao gồm alpha-glucan phosphorylaza (α GP, EC 2.4.1.1), maltoza phosphorylaza (MP, EC 2.4.1.8), xenlodextrin phosphorylaza (CDP, EC 2.4.1.49), xenlobioza phosphorylaza (CBP, EC 2.4.1.20), xenluloza phosphorylaza, sucroza phosphorylaza (SP, EC 2.4.1.7), và hỗn hợp của chúng. Việc chọn enzym hay hỗn hợp enzym tùy thuộc vào sacarit được sử dụng trong quy trình.

Sacarit được sử dụng để tạo ra G1P có thể là polysacarit, oligosacarit, và/hoặc disacarit. Ví dụ, sacarit có thể là tinh bột, một hoặc nhiều dẫn xuất của tinh bột, xenluloza, một hoặc nhiều dẫn xuất của xenluloza, sucroza, một hoặc nhiều dẫn xuất của sucroza, hoặc hỗn hợp của chúng.

Tinh bột là hợp chất dự trữ năng lượng được sử dụng nhiều nhất trong tự nhiên và được dự trữ nhiều nhất trong các hạt cây trồng. Tinh bột tự nhiên chứa amyloza mạch thẳng và amylopectin mạch nhánh. Ví dụ về các dẫn xuất tinh bột bao gồm amyloza, amylopectin, tinh bột hòa tan, amylodextrin, maltodextrin, maltoza, fructoza, và glucoza. Các ví dụ về các dẫn xuất xenluloza bao gồm sinh khối đã xử lý sơ bộ, xenluloza vô định hình được tái sinh, xenlodextrin, xenlobioza, fructoza, và glucoza. Các dẫn xuất sucroza bao gồm fructoza và glucoza.

Các dẫn xuất của tinh bột có thể được tạo ra bằng cách thủy phân bằng enzym tinh bột hoặc nhờ thủy phân tinh bột bằng axit. Cụ thể là, thủy phân tinh bột bằng enzym có thể được xúc tác hoặc được tăng cường bằng isoamylaza (IA, EC. 3.2.1.68), enzym này thủy phân liên kết α -1,6-glucozit; pullulanaza (PA, EC. 3.2.1.41), thủy phân liên kết α -1,6-glucozit; 4- α -glucanotransferaza (4GT, EC. 2.4.1.25), xúc tác chuyển glycosyl maltooligosacarit mạch ngắn, tạo ra maltooligosacarit mạch dài hơn; hoặc alpha-amylaza (EC 3.2.1.1), phân cắt liên kết α -1,4-glucozit.

Hơn nữa, các dẫn xuất xenluloza có thể được tạo ra bằng cách thủy phân bằng enzym xenluloza được xúc tác bởi hỗn hợp xenlulaza, bởi axit, hoặc bằng cách xử lý sơ bộ sinh khối.

Theo các phương án nhất định, các enzym được sử dụng để chuyển hóa sacarit thành G1P bao gồm α GP. Trong bước này, nếu sacarit bao gồm tinh bột, thì G1P được tạo ra từ tinh bột bởi α GP; nếu các sacarit chứa tinh bột hòa tan, amyloextrin, hoặc maltodextrin, G1P được tạo ra từ tinh bột hòa tan, amyloextrin, hoặc maltodextrin bằng α GP.

Nếu sacarit bao gồm maltoza và các enzym bao gồm maltoza phosphorylaza, G1P được tạo ra từ maltoza bằng maltoza phosphorylaza. Nếu sacarit bao gồm sucroza, và các enzym bao gồm sucroza phosphorylaza, G1P được tạo ra từ sucroza bằng sucroza phosphorylaza.

Theo một phương án khác nữa, nếu sacarit bao gồm xenlobioza, và các enzym bao gồm xenlobioza phosphorylaza, thì G1P được tạo ra từ xenlobioza bằng xenlobioza phosphorylaza.

Theo phương án khác, nếu các sacarit bao gồm xenloextrin và enzym bao gồm xenloextrin phosphorylaza, thì G1P được tạo ra từ xenloextrin bằng xenloextrin phosphorylaza.

Theo một phương án khác về chuyển hóa sacarit thành G1P, nếu sacarit bao gồm xenluloza, và các enzym bao gồm xenluloza phosphorylaza, thì G1P được tạo ra từ xenluloza bằng xenluloza phosphorylaza.

Theo sáng chế, tagatoza cũng có thể được tạo ra từ fructoza. Ví dụ về quy trình này được thể hiện trong FIG.4. Ví dụ, quy trình này bao gồm tạo ra F6P từ fructoza và polyphosphat được xúc tác bởi polyphosphat fructokinaza (PPFK); chuyển hóa F6P thành

T6P được xúc tác bởi F6PE; và chuyển hóa T6P thành tagatoza được xúc tác bởi T6PP. Fructoza có thể được tạo ra, ví dụ, bằng các chuyển hóa sucroza bằng enzym.

Theo các phương án khác, tagatoza có thể được tạo ra từ sucroza. Ví dụ về quy trình này được thể hiện trong FIG.6. Quy trình này đề cập đến con đường tổng hợp *in vitro* bao gồm các bước có sử dụng enzym như sau: tạo ra G1P từ sucroza và phosphat tự do được xúc tác bởi sucroza phosphorylaza (SP); chuyển hóa G1P thành G6P được xúc tác bởi PGM; chuyển hóa G6P thành F6P được xúc tác bởi PGI; chuyển hóa F6P thành T6P được xúc tác bởi F6PE; và chuyển hóa T6P thành tagatoza được xúc tác bởi T6PP.

Các ion phosphat được tạo ra khi T6P được chuyển hóa thành tagatoza sau đó có thể được tái tuần hoàn trong bước chuyển hóa sucroza thành G1P. Ngoài ra, như được thể hiện trong FIG.6, PPFK và polyphosphat có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất tagatoza bằng cách tạo ra F6P từ fructoza được sinh ra nhờ phân cắt sucroza bằng SP thông qua quá trình phosphoryl phân.

Theo một vài phương án, quy trình sản xuất tagatoza bao gồm các bước sau: tạo ra glucoza từ polysacarit và oligosacarit bằng cách thủy phân bằng enzyma hoặc thủy phân bằng axit, chuyển hóa glucoza thành G6P được xúc tác bởi ít nhất một enzym, tạo ra fructoza từ polysacarit và oligosacarit bằng cách thủy phân bằng enzym hoặc thủy phân bằng axit, và chuyển hóa fructoza thành G6P được xúc tác bởi ít nhất một enzym. Ví dụ về các polysacarit và các oligosacarit được mô tả trên đây.

Theo các phương án khác, G6P được sản xuất từ glucoza và natri polyphosphat bằng polyphosphat glucokinaza.

Sáng chế đề cập đến các quy trình chuyển hóa sacarit, như polysacarit và oligosacarit trong tinh bột, xenluloza, sucroza và các sản phẩm dẫn xuất của chúng, thành tagatoza. Theo các phương án của sáng chế, các con đường enzym không sử dụng ATP nhân tạo (không tự nhiên) được đề xuất để chuyển hóa tinh bột, xenluloza, sucroza, và các sản phẩm dẫn xuất của chúng thành tagatoza sử dụng hỗn hợp enzym không chứa tế bào.

Như được thể hiện trên đây, một vài enzym có thể được sử dụng để thủy phân tinh bột để làm tăng hiệu suất G1P. Các enzym như vậy bao gồm isoamylaza, pullulanaza, và alpha-amylaza. Tinh bột ngô có nhiều mạch nhánh để cản trở hoạt động của α GP. Isoamylaza có thể được sử dụng để khử nhánh tinh bột, tạo ra amyloextrin mạch thẳng. Tinh bột đã xử lý sơ bộ bằng isoamylaza có thể tạo ra F6P với nồng độ cao trong sản

phẩm cuối. Isoamylaza và pullulanaza phân cắt liên kết α -1,6-glycozit, mà cho phép làm thoái biến tinh bột hoàn toàn hơn bằng α -glucan phosphorylaza. α -amylaza phân cắt liên kết α -1,4-glycozit, do đó α -amylaza được sử dụng để làm thoái biến tinh bột thành các phân đoạn để chuyển hóa nhanh thành tagatoza.

Như được thể hiện trong FIG.2, maltoza phosphorylaza (MP) có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất tagatoza bằng cách phân cắt bằng quá trình phosphoryl phân sản phẩm thoái biến maltoza thành G1P và glucoza. Theo cách khác, 4-glucan transferaza (4GT) có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất tagatoza bằng cách tái tuần hoàn các sản phẩm thoái biến glucoza, maltoza, và maltotrioza thành maltooligosacarit dài hơn; mà có thể được phân cắt nhờ quá trình phosphoryl phân bằng α GP để tạo ra G1P.

Theo cách khác, xenluloza là nguồn sinh học dồi dào nhất và là thành phần chủ yếu của thành tế bào thực vật. Sinh khối lignoxenluloza không phải từ thực phẩm chứa xenluloza, hemixenluloza, và lignin cũng như là các thành phần thứ yếu khác. Xenluloza tinh khiết, bao gồm avicel (xenluloza vi tinh thể), xenluloza vô định hình được tái sinh, xenluloza vi khuẩn, giấy lọc, và v.v., có thể được tạo ra thông qua một loạt các bước xử lý. Các cơ chất xenluloza đã thủy phân một phần bao gồm xenlodextrin không hòa tan trong nước mà có mức polyme hóa lớn hơn 7, các xenlodextrin hòa tan trong nước có mức polyme hóa bằng 3-6, xenlobioza, glucoza, và fructoza.

Theo các phương án nhất định, xenluloza và các sản phẩm dẫn xuất của nó có thể được chuyển hóa thành tagatoza thông qua một loạt các bước. Ví dụ về quy trình này được thể hiện trong FIG.3. Quy trình này tạo ra con đường tổng hợp *in vitro* bao gồm các bước sau: tạo ra G1P từ xenlodextrin và xenlobioza và phosphat tự do được xúc tác bởi xenlodextrin phosphorylaza (CDP) và xenlobioza phosphorylaza (CBP), tương ứng; chuyển hóa G1P thành G6P được xúc tác bởi PGM; chuyển hóa G6P thành F6P được xúc tác bởi PGI; chuyển hóa F6P thành T6P được xúc tác bởi F6PE; và chuyển hóa T6P thành tagatoza được xúc tác bởi T6PP. Trong quy trình này, các ion phosphat có thể được tái tuần hoàn bằng bước chuyển hóa xenlodextrin và xenlobioza thành G1P.

Một vài enzym có thể được sử dụng để thủy phân xenluloza rắn thành các xenlodextrin hòa tan trong nước và xenlobioza. Các enzym như vậy bao gồm endoglucanaza và xenlobiohydrolaza, song không bao gồm beta-glucosidaza (xenlobiaza).

Trước khi thủy phân xenluloza và tạo ra G1P, xenluloza và sinh khối có thể được xử lý trước để làm tăng độ phản ứng và làm giảm mức polyme hóa của các chuỗi xenluloza. Các phương pháp xử lý trước xenluloza và sinh khối bao gồm xử lý trước bằng axit loãng, cắt phân đoạn lignoxenluloza trên cơ sở dung môi xenluloza, kéo dài sợi bằng amoniac, ngâm trong dung dịch nước amoniac, xử lý bằng dung dịch ion, và thủy phân một phần bằng cách sử dụng axit đậm đặc, kể cả axit clohydric, axit sulfuric, axit phosphoric và hỗn hợp của chúng.

Theo một vài phương án, polyphosphat và polyphosphat glucokinaza (PPGK) có thể được bổ sung vào quy trình, nhờ đó làm tăng hiệu suất của tagatoza nhờ phosphoryl hóa sản phẩm thoái biến glucoza thành G6P, như được thể hiện trong FIG.3.

Theo các phương án khác, tagatoza có thể được tạo ra từ glucoza. Một ví dụ về quy trình như vậy được thể hiện trong FIG.5. Quy trình bao gồm các bước tạo ra G6P từ glucoza và polyphosphat được xúc tác bởi polyphosphat glucokinaza (PPGK); chuyển hóa G6P thành F6P được xúc tác bởi PGI; chuyển hóa F6P thành T6P được xúc tác bởi F6PE; và chuyển hóa T6P thành tagatoza được xúc tác bởi T6PP.

Dung dịch đệm sinh học thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế, như HEPES, PBS, BIS-TRIS, MOPS, DIPSO, Trizma, v.v.. Dung dịch đệm phản ứng theo tất cả các phương án có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0. Tốt hơn nữa, độ pH của dung dịch đệm phản ứng có thể nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,3. Ví dụ, độ pH của dung dịch đệm phản ứng có thể là 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, hoặc 7,3.

Dung dịch đệm phản ứng cũng có thể chứa các cation kim loại chính. Ví dụ về các ion kim loại bao gồm Mg^{2+} và Zn^{2+} .

Nhiệt độ phản ứng tại đó các bước của quy trình được tiến hành có thể nằm trong khoảng từ 37 đến 85°C. Tốt hơn nữa, các bước có thể được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C. Nhiệt độ có thể là, ví dụ, khoảng 40°C, khoảng 45°C, khoảng 50°C, khoảng 55°C, hoặc khoảng 60°C. Tốt hơn, nhiệt độ phản ứng là khoảng 50°C.

Thời gian phản ứng của các quy trình được mô tả có thể được điều chỉnh nếu cần, và có thể nằm trong khoảng từ 8 giờ đến 48 giờ. Ví dụ, thời gian phản ứng có thể là khoảng 16 giờ, khoảng 18 giờ, khoảng 20 giờ, khoảng 22 giờ, khoảng 24 giờ, khoảng 26 giờ, khoảng 28 giờ, khoảng 30 giờ, khoảng 32 giờ, khoảng 34 giờ, khoảng 36 giờ,

khoảng 38 giờ, khoảng 40 giờ, khoảng 42 giờ, khoảng 44 giờ, khoảng 46 giờ, hoặc khoảng 48 giờ. Tốt hơn nữa, thời gian phản ứng là khoảng 24 giờ.

Quy trình theo sáng chế có thể đạt được hiệu suất cao do toàn bộ phản ứng có hằng số cân bằng rất tốt. Ví dụ, FIG.7 thể hiện năng lượng Gibbs phản ứng giữa các chất trung gian dựa trên sự tạo thành năng lượng Gibbs để chuyển hóa glucoza 1-phosphat thành tagatoza. Năng lượng Gibbs phản ứng được tạo ra dựa trên <http://equilibrator.weizmann.ac.il/>. Về mặt lý thuyết, tối đa 99% hiệu suất có thể đạt được nếu nguyên liệu ban đầu được chuyển hóa hoàn toàn thành chất trung gian.

Các quy trình theo sáng chế sử dụng các nguyên liệu ban đầu với chi phí thấp và làm giảm chi phí sản xuất nhờ làm giảm các chi phí có liên quan đến nguyên liệu cấp và việc tách sản phẩm. Tinh bột, xenluloza, sucroza và các dẫn xuất của nó là các nguyên liệu cấp có chi phí rẻ hơn, ví dụ, lactoza. Nếu tagatoza được sản xuất từ lactoza, glucoza và galactoza và tagatoza được tách bằng cách sắc ký, thì sẽ làm chi phí sản xuất cao hơn.

Ngoài ra, bước chuyển hóa T6P thành tagatoza theo sáng chế là phản ứng phosphataza không thuận nghịch, bất kể nguyên liệu cấp. Do đó, tagatoza được sản xuất với hiệu suất cao đồng thời làm giảm chi phí tách sản phẩm sau đó một cách hiệu quả.

Ngược với các phương pháp sản xuất trên cơ sở tế bào, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất tagatoza không sử dụng tế bào, có tốc độ phản ứng tương đối cao do loại bỏ màng tế bào, màng tế bào thường làm chậm sự vận chuyển cơ chất/sản phẩm vào và ra khỏi tế bào. Quy trình này cũng có sản phẩm cuối không chứa chất chuyển hóa tế bào/môi trường lên men giàu dinh dưỡng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Các hóa chất

Toàn bộ hóa chất, kể cả tinh bột ngô, tinh bột hòa tan, maltodextrin, maltoza, glucoza, giấy lọc là loại chất phản ứng hoặc loại cao hơn và được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) hoặc Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA), trừ khi được quy định theo cách khác. Các enzym giới hạn, T4 ligaza, và Phusion ADN polymeraza được mua từ New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Các oligonucleotit được tổng hợp bằng các công nghệ ADN kết hợp (Coralville, IA, USA) hoặc Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA). Xenluloza vô định hình được tái sinh được sử dụng trong quy

trình tinh chế enzym được điều chế từ Avicel PH105 (FMC BioPolymer, Philadelphia, PA, USA) nhờ hòa tan và tái sinh của nó, như được mô tả trong tài liệu: Ye et al., *Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of Clostridium thermocellum cellodextrin phosphorylaza on insoluble cellulose*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011; 92:551-560. *Escherichia coli* Sig10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) được sử dụng làm tế bào chủ để thao tác ADN và *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện protein tái tổ hợp. Môi trường ZYM-5052 chứa 100mg L⁻¹ ampicilin hoặc 50mg L⁻¹ kanamycin được sử dụng để phát triển tế bào *E. coli* và biểu hiện protein tái tổ hợp. Xenlulaza từ *Trichoderma reesei* (số Catalog: C2730) và pullulanaza (số Catalog: P1067) được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) và được sản xuất bởi Novozymes (Franklinton, NC, USA). Maltoza phosphorylaza (Số Catalog: M8284) được mua từ Sigma-Aldrich.

Tổng hợp và tinh chế enzym tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmit biểu hiện protein được ủ trong bình Erlenmeyer có dung tích 1L với 100mL môi trường ZYM-5052 chứa 100mg L⁻¹ ampicilin hoặc 50mg L⁻¹ kanamycin. Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và lắc quay ở tốc độ 220 vòng/phút trong 16-24 giờ. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở nhiệt độ 12°C và rửa một lần bằng HEPES 20mM (pH 7,5) chứa NaCl 50mM và MgCl₂ 5mM (kết tủa bằng nhiệt và môđun gắn kết với xenluloza) hoặc HEPES 20mM (pH 7,5) chứa NaCl 300mM và imidazol 5mM (tinh chế Ni). Các kết viên tế bào được tái huyền phù trong dung dịch đệm tương tự và được phân giải bằng cách siêu âm (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 500; tạo xung 5 giây và nghỉ 10 giây, tổng cộng 21 phút ở biên độ 50%). Sau khi ly tâm, các protein đích trong dịch nổi được tinh chế.

Ba phương pháp được sử dụng để tinh chế các protein tái tổ hợp khác nhau. Các protein có đuôi His được tinh chế bằng nhựa Profinity IMAC Ni-Charged (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Các protein dung hợp chứa môđun gắn kết với xenluloza (CBM) và intein tự phân cắt được tinh chế nhờ hấp thụ ái lực cao trên xenluloza vô định hình được tái sinh có diện tích bề mặt lớn. Kết tủa bằng nhiệt ở nhiệt độ 70-95°C trong 5-30 phút được sử dụng để tinh chế các enzym rất ổn định nhiệt. Độ tinh khiết của các protein tái tổ hợp được thử nghiệm bằng cách điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE).

Các enzym được sử dụng và các thử nghiệm hoạt tính của chúng

Alpha-glucan phosphorylaza (α GP) từ *Thermotoga maritima* (Uniprot ID G4FEH8) được sử dụng. Hoạt tính được thử nghiệm trong dung dịch đệm natri phosphat 50mM (pH 7,2) chứa $MgCl_2$ 1mM, DTT 5mM, và maltodextrin 30mM ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng được dừng nhờ lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO) (Vivaproducts, Inc., Littleton, MA, USA). Glucoza 1-phosphat (G1P) được đo bằng cách sử dụng kit thử nghiệm glucoza hexokinaza/G6PDH (Sigma Aldrich, Catalog No. GAHK20-1KT) được bổ sung 25U/mL phosphoglucomutaza. Đơn vị (U) được mô tả là μ mol/phút.

Phosphoglucomutaza (PGM) từ *Thermococcus kodakaraensis* (Uniprot ID Q68BJ6) được sử dụng. Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa $MgCl_2$ 5mM và G1P 5mM ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng được dừng bằng cách lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm glucoza 6-phosphat (G6P) được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm hexokinaza/G6PDH (Sigma Aldrich, Catalog No. GAHK20-1KT).

Hai nguồn khác nhau của phosphoglucoisomeraza (PGI) được sử dụng từ *Clostridium thermocellum* (Uniprot ID A3DBX9) và *Thermus thermophilus* (Uniprot ID Q5SLL6). Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa 5mM $MgCl_2$ và 10mM G6P ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng được dừng nhờ lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, fructoza 6-phosphat (F6P), được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym kết hợp fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD) trong đó giảm hấp thụ ở bước sóng 340nm chứng tỏ có sự tổng hợp F6P. 200 μ L dung dịch phản ứng này chứa HEPES 50mM (pH 7,2), $MgCl_2$ 5mM, G6P 10mM, ATP 1,5mM, phosphoenol pyruvat 1,5mM, NADH 200 μ M, PGI 0,1 U, PK 5 U, và LD 5 U.

Fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE) từ *Dictyoglomus thermophilum* (Uniprot ID B5YBD7) được sử dụng. Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa $MgCl_2$ 5mM, và F6P 10mM ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng được dừng nhờ lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, tagatoza 6-phosphat (T6P), được xác định bằng cách sử dụng tagatoza 6-phosphat phosphataza và phát hiện sự giải phóng phosphat tự do. Để phát hiện sự giải phóng phosphat tự do, 500 μ L dung dịch chứa kẽm axetat 0,1M và amoni molybdat 2mM (pH 5) được bổ sung vào 50 μ L phản ứng. Hỗn hợp được trộn và được bổ sung 125 μ L 5% axit ascorbic (pH 5). Dung

dịch này được trộn sau đó được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 20 phút. Mức hấp thụ ở bước sóng 850nm được đọc để xác định mức giải phóng phosphat tự do.

F6PE ưa nhiệt từ *Anaerolinea thermophila* UNI-1 (Uniprot ID: E8N0N6)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 1)

ATGTTTCGGCTCGCCTGCTCCCCTGCTGGATATGGTCACCGCGCAGAAACA
GGGCATGGCGCGGGGTATCCCATCCATTTGTTTCGGCACATCCGGTGGTGC
TGAGTGCCGCCTGCCATCTTGCCCGCCGGAGCGGCGCGCCCCTGCTCATC
GAAACCACCTGCAATCAGGTCAACCACCAAGGTGGGTACAGCGGCATGA
CCCCCGCCGATTTTGTCCGCTTTCTGCGCGAAATTCTGGAACGGGAAGGTA
TTCCCCCGCAACAGGTCATCCTGGGCGGGGATCACCTGGGTCCTTACCCCT
GGCGGAAAGAGCCTGCCGAAACCGCCATAGCACAAGCGCTGGAAATGGT
GCGGGCATACTGTCAGGCAGGCTACACCAAAATTCATCTGGACGCTTCCA
TGCCCTGCGCCGATGACGACCCCGAGCGTCCCCTGCCGCTGGAGCGCATA
GCCCCGACGGGCGGCGCAGTTGTGCGCCGCCGCGAAGCCGCCGCGGGAG
CGGTTTCAGCCGGTGTACGTAATTGGCAGTGAGGTGCCCCCGCCCGGCGGC
GCGCAGGGTCAGGAGGCAAGACTTCACGTCACCACTCCGCAGGAAGCCC
AAGCCGCGCTGGATGCCTTTCGGGAAGCCTTTCTGCAGGCAGGCTTGACT
CCCGTTTGGGAGCGGGTCATTGCGCTGGTAGTCCAGCCGGGGGTGGAGTT
TGGCGTGGACAGCATTCACGCCTATCAGCGCGAAGCCGCCCGCCCGCTGA
AGACCTTCATCGAGGGCGTGCCCGGCATGGTGTATGAAGCCCACTCGACC
GATTACCAGACCCGTGCCTCCCTGCGTGCGCTGGTGGAAAGACCACTTTTCC
ATTCTCAAGGTTGGTCCGGCACTAACCTTTGCCTACCGCGAAGCCGTGTTC
GCCCTGGAACACATCGAACGGGAATATTGGGCAGGCAGGATATGCCTCT
CTCCCGCCTGAGTGAAGTCCTCGACGAGGTGATGCTGAACGATCCACGCC
ACTGGCAGGGATACTTTGCCGGCGCTCCCGCCGAACAGGCGCTGGCGCGC
CGCTACAGTTTTCAGCGACCGCATTCGCTATTACTGGCACCATCCCGCCGCG
CAGGAAGCCGTGCGGAGACTGCTCGCCAACCTGATCGAAACCCCGCCGCC
GCTGAGTTTGCTCAGCCAGTACCTGCCGCGCGAGTATGAGATGGTGCGCG
CGGGGGAAATCTCCAGCCACCCGCAGGACCTGATTCGGGCACATATCCAG
CACACGCTGGAAGATTACGCTGCGGGCGTGCGGGTAA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 2)

MFGSPAPLLDMVTAQKQGMARGIPSICSAHPVVLSAACHLARRSGAPLLIETT
 CNQVNHQGGYSGMTPADDFVRFLREILEREGIPPQQVILGGDHLGPYPWRKEP
 AETAIAQALEMVRAYVQAGYTKIHLDASMPCADDDPERPLPLERIARRAAQL
 CAAAEAAAGAVQPVYVIGSEVPPPGGAQGQEARLHVTTTPQEAQAALDAFRE
 AFLQAGLTPVWERVIALVVQPGVEFGVDSIHAYQREAAARPLKTFIEGVPGMV
 YEAHSTDYQTRASLRALVEDHFSILKVGPALTFAYREAVFALEHIEREILGRQ
 DMPLSRLSEVLDEVMLNDPRHWQGYFAGAPAEQALARRYSFSDRIRYYWHH
 PAAQEAVRRLLANLIETPPPLSLLSQYLPREYEMVRAGEISSHPQDLIRAHIQH
 TLEDYAAACG

F6PE ưa nhiệt từ *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* (Uniprot ID: E4SEH3)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 3)

ATGAGTCCTCAAATCCATTGATTGGTTTATTTAAGAATAGAGAAAAAGA
 GTTTAAGGGTATTATTTTCAGTTTGTCTTCAAATGAAATAGTCTTAGAAGC
 AGTTTTAAAAAGAATGAAAGATACAAACCTACCAATTATTATTGAAGCCA
 CAGCGAACCAGGTAAATCAATTTGGCGGGTATTCTGGGTTGACACCGTCT
 CAGTTCAAAGAACGAGTTATAAAAATTGCTCAAAAAGTTGATTTTCCACT
 TGAGAGAATAATTCTTGGTGGGGACCATCTTGGACCATTTGTGTGGCGTG
 ACCAGGAACCAGAAATTGCTATGGAGTATGCTAAGCAAATGATAAAAGA
 ATACATAAAAGCAGGTTTTACCAAATTCACATCGACACGAGTATGCCTT
 TAAAAGGGGAGAACAGCATAGATGATGAAATAATTGCTAAAAGAACTGC
 TGTGCTCTGCAGGATTGCGGAGGAGTGTTTTGAGAAGATTTCTATAAACA
 ATCCCTATATTACAAGGCCAGTTTATGTGATAGGAGCTGATGTGCCACCTC
 CCGGCGGAGAGTCTTCTATTTGTCAAACAATTACTACTAAAGATGAATTA
 GAAAGAAGTTTAGAATATTTCAAAGAAGCATTAAAAAGGAAGGAATTG
 AGCATGTATTCGATTATGTAGTTGCTGTTGTTGCAAATTTTGGAGTTGAAT
 TTGGGAGCGATGAAATTGTTGATTTTGATATGGAAAAAGTAAAGCCGCTA
 AAAGAAGTTTTGGCAAAGTACAATATAGTATTTGAAGGCCATTCTACAGA
 TTATCAAACAAAAGAAAAGTTAAAAAGAATGGTCGAATGTGGTATTGCAA
 TTTTAAAGGTTGGTCCTGCTCTAACATTTACATTGCGCGAAGCGTTAGTAG
 CACTTAGTCATATTGAAGAAGAAATTTATAGCAATGAAAAGGAGAACTG
 TCAAGATTTAGAGAAGTTTTATTGAATACTATGCTAACATGCAAAGATCA
 CTGGAGTAAATATTTTGATGAGAATGATAAGTTAATTAAGTCAAAGCTCC

TATATAGCTATCTTGACAGATGGAGATACTATTTTGAAAACGAGAGTGTG
 AAAAGTGCTGTTTATTCTCTTATTGGAAATTTAGAGAATGTTAAAATTCCA
 CCTTGGCTTGTAAGTCAGTATTTTCCTTCTCAGTACCAAAAGATGAGAAAA
 AAAGATTTAAAAAACGGTGCTGCCGACCTAATATTGGATAAAATAGGGGA
 AGTCATTGACCATTATGTTTATGCGGTAAAAGAATAA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 4)

MSPQNPLIGLFKNREKEFKGIISVCSSNEIVLEAVLKRMKDTNLPPIIEATANQV
 NQFGGYSGLTPSQFKERVIKIAQKVDFPLERIILGGDHLGPFVWRDQEPEIAME
 YAKQMIKEYIKAGFTKIHIDTSMPLKGENSIDDEIIAKRTAVLCRIAEECFEKISI
 NNPYITRPVYVIGADVPPPGESSICQTITTKDELSLEYFKEAFKKEGIEHVF
 DYVVAVVANFGVEFGSDEIVDFDMEKVKPLKELLAKYNIVFEHSTDYQTK
 NLKRMVECGIAILKVGPALTFTLREALVALSHIEEEIYSNEKEKLSRFREVLLN
 TMLTCKDHWKSYFDENDKLIKSKLLYSYLDWRWRYFENESVKSAVYSLIGNL
 ENVKIPPWLVSQYFPSQYQKMRKKDLKNGAADLILDKIGEVIDHYVYAVKE

F6PE ưa nhiệt từ *Caldilinea aerophila* (Uniprot ID: I0I507)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 5)

ATGTCAACACTTCGCCACATCATTTTGCGACTGATCGAGCTGCGTGAACG
 AGAACAGATCCATCTCACGCTGCTGGCCGTCTGTCCCAACTCGGCGGCGG
 TGCTGGAGGCAGCGGTGAAGGTCGCCGCGCGCTGCCACACGCCGATGCTC
 TTCGCTGCCACGCTCAATCAAGTCGATCGCGACGGCGGCTACACCGGTTG
 GACGCCTGCGCAATTCGTCGCCGAGATGCGTCGCTATGCCGTCCGCTATG
 GCTGCACCACCCCGCTCTATCCTTGCCTGGATCACGGCGGGCCGTGGCTCA
 AAGATCGCCATGCACAGGAAAAGCTACCGCTCGACCAGGCGATGCATGA
 GGTCAAGCTGAGCCTCACCGCCTGTCTGGAGGCCGGCTACGCGCTGCTGC
 ACATCGACCCACGGTCGATCGCACGCTCCCGCCCGGAGAAGCGCCGCTC
 GTGCCGATCGTCGTCGAGCGCACGGTCGAGCTGATCGAACATGCCGAACA
 GGAGCGACAGCGGCTGAACCTGCCGGCGGTCGCCTATGAAGTCGGCACCG
 AAGAAGTACATGGCGGGCTGGTGAATTTTCGACAATTTTGTGCGCTTCTTGG
 ATTTGCTCAAGGCAAGGCTTGAACAACGTGCCCTGATGCACGCCTGGCCC
 GCCTTCGTGGTGGCGCAGGTCGGCACTGACCTGCATACAACGTATTTTGA
 CCCCAGTGCGGCGCAACGGCTGACTGAGATCGTGCGCCCTACCGGTGCAC
 TGTTGAAGGGGCACTACACCGACTGGGTGCGAAAATCCCGCCGACTATCCG

AGGGTAGGCATGGGAGGCGCCAACGTTGGTCCAGAGTTTACGGCGGCCG
 AGTTCGAGGCGCTGGAAGCGCTGGAACGGCGGGAACAACGGCTGTGCGC
 CAACCGGAAATTGCAGCCCGCCTGTTTTTTGGCTGCACTGGAAGAGGCAG
 TAGTCGCTTCAGATCGTTGGCGGAAGTGGCTCCAGCCCGATGAGATCGGC
 AAGCCCTTTGCAGAATTAACGCCCCGCACGCCGGCGCTGGCTCGTGCAGAC
 CGGGGACGCTACGTCTGGACTGCGCCGAAAGTTATCGCCGCACGCGAAC
 AGCTCTATGCGCACCTCTCCCTTGTGCAGGCGGATCCACATGCCTACGTGG
 TAGAGTCAGTCGCCCCGGTCAATCGAGCGCTATATCGATGCCTTCAACTTAT
 ACGACGCCGCTACATTGCTTGGATGA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 6)

MSTLRHIILRLIELREREQIHLTLLAVCPNSAAVLEAAVKVAARCHTPMLFAA
 TLNQVDRDGGYTGWTPAQFVAEMRRYAVRYGCTTPLYPCLDHGGPWLKDR
 HAQEKPLDQAMHEVKLSLTACLEAGYALLHIDPTVDRTLPPGEAPLVPIVVE
 RTVELIEHAEQERQRLNLPVAYEYVGTEEVHGGLVNFDNFVAFLLDKARLE
 QRALMHAWPAFVVAQVGTDLHTTYFDPSAAQRLTEIVRPTGALLKGHYTDW
 VENPADYPRVGMGGANVGPEFTAAEFEALEALERREQRLCANRKLQPACFL
 AALEEAVVASDRWRKWLQPDEIGKPFAELTPARRRWLVQTGARYVWTAPK
 VIAAREQLYAHLSLVQADPHAYVVESVARSIERYIDAFNLYDAATLLG

F6PE ưa nhiệt từ *Caldithrix abyssi* (Uniprot ID: H1XRG1)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 7)

ATGAGTCTGCATCCTTTAAATAAATTAATCGAGCGACACAAAAAAGGAAC
 GCCGGTCGGTATTTATTCCGTCTGTTCGGCCAATCCCTTTGTTTTGAAAGC
 GGCCATGCTACAGGCGCAAAAGGATCAGTCTTTGCTACTTATTGAGGCCA
 CTTCCAACCAGGTAGATCAATTCGGCGGTTACACCGGCATGCGGCCCGAA
 GATTTTAAAACAATGACGCTTGAAGTGGCAGCCGAAAACAATTACGATCC
 ACAGGGATTAATCCTGGGCGGCGACCATCTGGGGCCCAACCGCTGGACAA
 AACTGAGCGCCTCCCGGGCCATGGACTACGCCAGAGAGCAGATTGCCGCT
 TATGTTAAAGCCGGCTTTTCCAAAATCCACTTAGACGCCACCATGCCCTTG
 CAAAACGATGCCACAGATTCCGCCGGCCGCCTTCCAGTCGAAACAATCGC
 TCAACGTACCGCAGAATTATGCGCCGTGGCCGAACAACTTACCGGCAGA
 GCGACCAACTCTTTCCGCCGCCTGTTTACATTGTCGGCAGCGACGTGCCCA
 TCCCGGGCGGCGCGCAAGAAGCGCTGAACCAGATCCATATTACGGAGGTA

AAAGAGGTTCAACAGACCATTGATCACGTGCGGCGGGCCTTTGAAAAAAA
 CGGCCTGGAAGCGGCTTACGAAAGAGTTTGCGCCGTTGTCGTGCAGCCAG
 GCGTTGAATTCGCCGATCAAATCGTTTTTTGAATACGCTCCCGACAGAGCG
 GCGGCCTTAAAAGATTTTATTGAAAGCCATTCGCAGCTGGTTTATGAAGC
 GCACTCTACTGATTACCAGACCGCACCTCTTTTGCGCCAGATGGTAAAAG
 ATCACTTTGCCATTTTAAAGGTCGGGCCTGCGCTCACCTTTGCCCTGCGCG
 AAGCCATTTTTGCTCTGGCCTTTATGGAAAAAGAGCTTTTGCCATTGCACA
 GAGCGCTCAAACCTTCTGCCATTCTGGAAACGCTGGACCAAACGATGGAC
 AAAAACCTGCTTACTGGCAAAAGCATTACGGCGGAACAAAGGAAGAAG
 TACGCTTTGCGCAGCGGTTTAGCCTGAGCGACCGCATTCGTTACTACTGGC
 CGTTTCCAAAGGTTCAAAGGCCCTGCGCCAATTGCTAAAAAACTTGCAA
 CAAATTTCCATTCCTCTAACTTTGGTAAGCCAGTTCATGCCAGAGGAATAC
 CAACGTATTCGCCAAGGAACGTTAACCAACGATCCGCAGGCGCTGATTTT
 GAACAAAATTCAAAGCGTATTAAAGCAATACGCGGAGGCGACGCAAATT
 CAAAACCTCTTTGACATTCACGCAAAATCAAATTCATTAGCAATGGAGCG
 ACTATGA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 8)

MSLHPLNKLIERHKKGTPVGIYSVCSANPVLKAAMLQAQKDQSLLLIEATSN
 QVDQFGGYTGMRPEDFKTMTLELAAENNYDPQGLILGGDHLGPNRWTKLSA
 SRAMDYAREQIAAYVKAGFSKIHLDATMPLQNDATDSAGRLPVETIAQRTAE
 LCAVAEQTYRQSDQLFPPPVYIVGSDVPIPGGAQEALNQIHTEVKEVQQTIDH
 VRRAFEKNGLEAAYERVCAVVVQPGVEFADQIVFEYAPDRAAALKDFIESHS
 QLVYEAHSTDYQTAPLLRQMVKDHFALKVGPALTFALREAI FALAFMEKEL
 LPLHRALKPSAILETLTDQTMCKNPAYWQKHYYGGTKEEVRFARFSLSDRIRY
 YWPFPKVQKALRQLLKNLQQISIPLTLVSQFMPEEYQRIRQGTLTNDPQALIL
 NKIQSVLKQYAEATQIQNSLTFTQNQNSLAMERL

F6PE ưa nhiệt từ *Dictyoglomus thermophilum* (Uniprot ID: B5YBD7)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 9)

ATGTGGCTTAGTAAAGATTATTTGAGAAAAAAGGGAGTTTATTCTATATG
 TAGCTCTAATCCATATGTGATTGAGGCAAGTGTTGAATTTGCTAAGGAGA
 AGAATGATTATATTTTAATTGAGGCGACACCTCATCAGATAAACCAGTTT
 GGTGGATATTCAGGTATGACTCCCGAAGATTTTAAAAACTTTGTAATGGG

AATAATAAAAGAAAAGGGAATAGAAGAGGATAGGGTGATTCTTGGAGGG
 GACCATTTAGGCCCTCTCCCTTGGCAAGATGAACCTTCTTCTTCTGCAATG
 AAAAAGGCAAAAGACCTTATAAGGGCCTTTGTGGAGAGTGGTTATAAGA
 AGATACACCTTGATTGTAGTATGTCTCTTTCTGATGATCCTGTAGTGCTCT
 CTCCCGAGAAGATAGCAGAAAGGGAGAGGGAACTTCTTGAGGTTGCAGA
 AGAGACTGCTAGAAAGTACAATTTTCAGCCTGTGTATGTGGTGGGAACTG
 ATGTACCGGTAGCTGGAGGAGGCGAAGAGGAAGGTATTACCTCAGTGGA
 GGATTTTAGAGTAGCAATCTCCTCTTTAAAAAAATATTTTGAGGATGTTCC
 AAGGATATGGGATAGGATAATTGGTTTTGTAAATAATGCTTGGTATAGGTTT
 TAATTATGAAAAAGTGTTTGAGTATGACAGGATTAAGGTGAGAAAAATTT
 TAGAGGAGGTAAAGAAAGAGAATCTTTTTGTTGAAGGTCCTCTACTGAC
 TATCAGACAAAACGTGCATTGAGAGATATGGTAGAGGATGGAGTAAGAA
 TTCTTAAGGTTGGTCCTGCTTTAACAGCAAGTTTTAGAAAGGGGAGTATTTT
 TATTAAGTAGCATTGAGGATGAGCTTATATCGGAAGATAAAAGGTCTAAT
 ATTAAGAAAGTTGTGCTTGAGACTATGTTAAAAGATGATAAATATTGGAG
 AAAGTATTATAAGGATTCAGAAAGATTAGAATTAGATATTTGGTACAAC
 TACTTGATAGGATTAGATATTATTGGGAATATAAAGAGATAAAAAATAGCT
 TTAAATAGGCTTTTTGAAAATTTTTTCGGAAGGGGTTGATATTAGATACATC
 TATCAATATTTTTATGATTCGTATTTTAAAGTAAGAGAAGGAAAAATAAG
 AAATGATCCAAGGGAGCTAATAAAGAATGAAATAAAGAAGGTCTTGGAG
 GACTATCACTATGCTGTAAACTTATAA

Trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon (SEQ ID NO.: 10)

ATGTGGCTGAGCAAGGACTACCTGCGTAAGAAGGGCGTTTACAGCATTTG
 CAGCAGCAACCCGTATGTTATTGAAGCGAGCGTGGAGTTCGCGAAGGAGA
 AAAACGATTACATCCTGATTGAAGCGACCCCGCACCAGATCAACCAATTT
 GGTGGCTATAGCGGCATGACCCCGGAGGACTTCAAGAACTTTGTTATGGG
 CATCATTAAGGAAAAAGGTATCGAGGAAGACCGTGTGATTCTGGGTGGCG
 ATCACCTGGGTCCGCTGCCGTGGCAGGATGAGCCGAGCAGCAGCGCGATG
 AAGAAAGCGAAAGACCTGATCCGTGCGTTCGTTGAAAGCGGTTACAAGA
 AAATTCACCTGGATTGCAGCATGAGCCTGAGCGACGATCCGGTGGTTCTG
 AGCCCGGAGAAGATCGCGGAACGTGAGCGTGAAGTCTGGAAGTTGCGG
 AGGAAACCGCGCGTAAATACAACCTTCAACCGGTGTATGTGGTGGGTACC

GATGTTCCGGTTGCGGGTGGCGGTGAGGAAGAGGGTATCACCAGCGTGGA
 GGACTTCCGTGTTGCGATTAGCAGCCTGAAGAAATACTTTGAAGACGTTC
 CGCGTATTTGGGATCGTATCATTGGTTTCGTGATCATGCTGGGCATTGGTT
 TCAACTACGAGAAGGTGTTTGAATATGATCGTATCAAAGTGCGTAAAATT
 CTGGAAGAGGTTAAGAAAGAGAACCTGTTTGTGGAAGGCCACAGCACCG
 ACTATCAGACCAAGCGTGCGCTGCGTGACATGGTGGAGGATGGCGTTCGT
 ATCCTGAAAGTGGGTCCGGCGCTGACCGCGAGCTTCCGTCGTGGTGTGTTT
 CTGCTGAGCAGCATCGAGGACGAACCTGATTAGCGAGGATAAACGTAGCA
 ACATTAAGAAAGTGGTTCTGGAACCATGCTGAAGGACGATAAATACTGG
 CGTAAGTACTATAAAGACAGCGAGCGTCTGGAAGTGGATATCTGGTACAA
 CCTGCTGGACCGTATTCGTTACTACTGGGAGTACAAGGAAATCAAGATTG
 CGCTGAACCGTCTGTTCGAGAACTTTAGCGAAGGCGTTGATATCCGTTAC
 ATCTACCAATACTTCTACGACAGCTACTTCAAAGTGCGTGAGGGTAAAAT
 CCGTAACGACCCGCGTGAACCTGATTAAGAACGAGATTAAGAAAGTGCTGG
 AAGACTACCATTATGCGGTGAACCTGTAA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 11)

MWLSKDYLRRKGVYSICSSNPYVIEASVEFAKEKNDYILIEATPHQINQFGGY
 SGMTPEDFKNFVMGIIKEKGIEEDRVILGGDHLGPLPWQDEPSSSAMKKAKD
 LIRAFVESGYKKIHLDCSMSLSDDPVVLSPKIAERERELLEVAEETARKYNFQ
 PVYVVGTDVPVAGGGEEEGITSVEDFRVAISSLKKYFEDVPRIWDRIIGFVIML
 GIGFNYEKVFEYDRIKVRKILEEVKKENLFVEGHSTDYQTKRALRDMVEDGV
 RILKVGPAALTASFRRGVFLSSIEDELISEDKRSNIKKVVLETMLKDDKYWRK
 YYKDSERLELDIWYNLLDRIRYYWEYKEIKIALNRLFENFSEGVDIRYIYQYF
 YDSYFKVREGKIRNDPRELIKNEIKKVLEDYHYAVNL

Tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP) từ *Archaeoglobus fulgidus* (Uniprot ID O29805) được sử dụng. Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa MgCl₂ 5mM và T6P 10mM ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng này được dừng nhờ lọc enzyme bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sự sản xuất tagatoza được xác định bằng cách phát hiện sự giải phóng phosphat tự do như được mô tả đối với F6PE.

T6PP ra nhiệt từ *Archaeoglobus fulgidus* (Uniprot ID:O29805)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 12)

ATGTTCAAACCAAAGGCCATCGCAGTTGACATAGATGGCACCCCTCACCGA
 CAGAAAGAGGGGCTCTGAACTGCAGGGGCTGTTGAAGCTCTCCGCAAGGTAA
 AAATTCCCGTGATTTTGGCCACTGGTAACATATCTTGTTTTGCGAGGGGCTG
 CAGCAAAGCTGATTGGAGTCTCAGACGTGGTAATCTGCGAGAATGGGGGC
 GTGGTGAGGTTTCGAGTACGATGGGGAGGATATTGTTTTAGGAGATAAAGA
 GAAATGCGTTGAGGCTGTGAGGGTGCTTGAGAAACACTATGAGGTTGAGC
 TGCTGGACTTCGAATACAGGAAGTCGGAAGTGTGCATGAGGAGGAGCTTT
 GACATCAACGAGGCGAGAAAGCTCATTGAGGGGATGGGGGTAAAGCTTG
 TGGATTCAGGCTTTGCCTACCACATTATGGATGCTGATGTTAGCAAGGGA
 AAAGCTTTGAAGTTCGTTGCCGAGAGGCTTGGTATCAGTTCAGCGGAGTT
 TGCAGTTATCGGCGACTCAGAGAACGACATAGACATGTTTCAGAGTTGCTG
 GATTCGGAATTGCTGTTGCCAATGCCGATGAGAGGCTGAAGGAGTATGCT
 GATTTAGTTACGCCATCACCAGACGGCGAGGGGGTTGTTGAGGCTTTGCA
 GTTTCTGGGATTGTTGCGGTGA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 13)

MFKPKAIAVDIDGTLTDRKRALNCRAVEALRKVKIPVILATGNISCFARAAAK
 LIGVSDVVICENGGVVRFEYDGEDIVLGDKEKCV EAVRVLEKHYEVELLD FE
 YRKSEVCMRRSFDINEARKLIEGMGVKLVD SGFAYHIMDADVSKGKALKFV
 AERLGISSAEFAVIGDSENDIDMFRVAGFGIAVANADERLKEYADLVTPSPDG
 EGVVEALQFLGLLR

T6PP từ *Archaeoglobus profundus* (Uniprot ID D2RHH2_ARCPA)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 14)

GTGTTCAAGGCTTTGGTAGTTGATATAGACGGAACCTTGACGGATAAGAA
 GAGGGCAATAAACTGCAGAGCGGTCGAAGCACTTAGAAA ACTAAAGATT
 CCTGTTGTCTTGGCAACCGGAAACATTT CATGCTTTGCAAGGGCTGTAGCT
 AAGATTATAGGTGTTTCCGATATTGTAATAGCTGAGAACGGAGGTGTTGT
 CAGATTCAGCTACGACGGAGAGGACATAGTTCTGGGGGATAGAAGTAAA
 TGCTTAAGAGCTTTGGAGACACTTAGAAAACGCTTCAAAGTAGAGCTTCT
 CGACAACGAATATAGGAAGTCTGAGGTCTGCATGAGGAGGAACTTCCCTA
 TAGAGGAAGCTAGAAAGATACTGCCAAAAGATGTTAGAATAGTCGATAC
 AGGCTTCGCATACCACATAATCGATGCAAATGTCAGCAAGGGGAAGGCTT
 TGATGTT CATAGCCGATAAGCTTGGCTTGGACGTTAAGGATTT CATTGCGA

TAGGTGATTCCGAAAACGACATTGAAATGTTGGAAGTTGCAGGTTTTGGC
 GTTGCAGTTGCGAATGCGGATGAAAAGCTTAAGGAGGTAGCGGATTTGGT
 CACATCGAAGCCTAATGGAGACGGAGTTGTCTGAAGCTCTTGAGTTCTTGG
 GACTCATTTAG

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 15)

MFKALVVDIDGTLTDKKRAINCR AVEALRKLKIPVVLATGNISCFARAVAKII
 GVSDIVIAENGGVVRFSYDGEDIVLGDRSKCLRALET LRKRFKVELLDNEYRK
 SEVCMRRNFP IEEARKILPKDVRIVDTGFAYHIIDANVSKGKALMFIADKLGL
 DVKDFIAIGDSENDIEMLEVAGFGVAVANADEKLKEVADLVT SKPNGDGVV
 EALEFLGLI

T6PP từ *Archaeoglobus veneficus* (Uniprot ID F2KMK2_ARCVS)

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.: 16)

ATGCTCCGTCCAAAGGGTCTCGCCATTGACATCGACGGAACCATAACATA
 CAGGAATCGAAGCCTGAACTGTAAGGCCGTTGAAGCTCTCAGGAAGGTAA
 AAATCCCTGTAGTTCTTGCAACTGGCAACATATCCTGTTTCGCAAGAACTG
 CTGCAAAGCTTATAGGCGTCTCAGACATTGTTATATGCGAAAATGGAGGT
 ATTGTTTCGATTCAGCTACGATGGCGACGACATAGTGCTTGGGGACATAAG
 CAAATGCCTTAAAGCGGCTGAAATTCTCAAAGAGTACTTTGAAATCGAAT
 TCCTTGACGCTGAGTACAGGAAGTCGGAGGTCTGTCTTCGCAGAACTTT
 CCTATTGAAGAGGCGAGGAAAATTCTTCACGATGCAAAGCTTGATGTTAA
 AATCGTCGATTCAGGTTTTGCGTACCACATAATGGATGCGAAGGTCAGCA
 AAGGAAGGGCTCTTGAGTACATAGCTGATGAACTTGGTATAAGTCCGAAG
 GAGTTCGCTGCAATTGGTGATTCTGAGAACGACATAGACCTGATTAAGGC
 TGCCGGCCTCGGTATTGCCGTTGGAGATGCTGACTTAAAGCTCAAAATGG
 AGGCCGACGTGGTAGTCTCGAAGAAGAATGGCGATGGAGTTGTTGAAGC
 ACTTGAGCTTCTGGGCTTAATTTAA

Trình tự axit amin (SEQ ID NO.: 17)

MLRPKGLAIDIDGTITYRNRSLNCKAVEALRKVKIPVVLATGNISCFARTAAK
 LIGVSDIVICENGGIVRFSYDGDDIVLGDISKCLKAAEILKEYFEIEFLDAEYRK
 SEVCLRRNFP IEEARKILHDAKLDVKIVDSGFAYHIMDAKVSKGRALEYIADE
 LGISPKEFAAIGDSENDIDLIKAAGLGIAVG DADLKLKMEADV VVSKKNGDG
 VVEALELLGLI

Xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza phosphorylaza tái tổ hợp từ *C. thermocellum* được mô tả trong tài liệu của Ye và các đồng tác giả. Việc sản xuất hydro tự phát có hiệu suất cao từ các nguyên liệu xenlulo và nước được xúc tác bởi các hỗn hợp enzym. ChemSusChem 2009; 2:149-152. Các hoạt tính của chúng được thử nghiệm như được mô tả.

Polyphosphat glucokinaza tái tổ hợp từ *Thermobifida fusca* YX được mô tả trong tài liệu của Liao và các đồng tác giả, One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphat glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphat generation without ATP. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012; 93:1109-1117. Các hoạt tính của enzym này được thử nghiệm như được mô tả.

Isoamylaza tái tổ hợp từ *Sulfolobus tokodaii* được mô tả trong tài liệu của Cheng và các đồng tác giả, Doubling power output of starch biobattery treated by the most thermostable isoamylase from an archaeon *Sulfolobus tokodaii*. Scientific Reports 2015; 5:13184. Các hoạt tính của enzym này được thử nghiệm như được mô tả.

4-alpha-glucanoltransferaza tái tổ hợp từ *Thermococcus litoralis* được mô tả trong tài liệu của Jeon và các đồng tác giả 4- α -Glucanotransferase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus Litoralis*. Eur. J. Biochem. 1997; 248:171-178. Hoạt tính của enzym này được đo như được mô tả.

Sucroza phosphorylaza từ *Caldithrix abyssi* (Uniprot H1XT50) được sử dụng. Hoạt tính của enzym này được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,5) chứa sucroza 10mM và phosphat hữu cơ 12mM. Glucoza 1-phosphat (G1P) được đo bằng cách sử dụng kit thử nghiệm glucoza hexokinaza/G6PDH được bổ sung 25U/mL phosphoglucomutaza và alpha-glucan phosphorylaza.

Các đơn vị enzym được sử dụng trong mỗi ví dụ dưới đây có thể được tăng hoặc giảm để điều chỉnh thời gian phản ứng nếu muốn. Ví dụ, nếu một enzym muốn thực hiện phản ứng nêu trong ví dụ 9 trong 8 giờ thay vì 24 giờ, thì các đơn vị của các enzym này cần được tăng lên gấp khoảng 3 lần. Ngược lại nếu một enzym muốn thực hiện phản ứng nêu trong ví dụ 9 trong 48 giờ thay vì 24 giờ thì các đơn vị enzym có thể được làm giảm khoảng 2 lần. Các ví dụ này minh họa cách sử dụng lượng các đơn vị enzym để làm tăng hoặc làm giảm thời gian phản ứng đồng thời vẫn duy trì được hiệu suất không đổi.

Ví dụ 1

Để đánh giá tính khả thi về mặt kỹ thuật của quy trình sinh tổng hợp fructoza 6-phosphat từ tinh bột nhờ enzym, ba enzym được biểu hiện tái tổ hợp: alpha-glucan phosphorylaza từ *T. maritime* (Uniprot ID G4FEH8), phosphoglucomutaza từ *Thermococcus kodakaraensis* (Uniprot ID Q68BJ6), và phosphoisomeraza từ *Clostridium thermocellum* (Uniprot ID A3DBX9). Các protein tái tổ hợp được biểu hiện quá mức trong *E. coli* BL21 (DE3) và được tinh chế như được mô tả trên đây.

0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa 10g/L tinh bột hòa tan, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, $ZnCl_2$ 0,5mM, αGP 0,01U, PGM 0,01U, và PGI 0,01U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Phản ứng được dừng bằng cách lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, fructoza 6-phosphat (F6P), được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym kết hợp fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD) trong đó mức hấp thụ ở bước sóng 340nm giảm chứng tỏ có sự tổng hợp F6P như được mô tả trên đây. Nồng độ cuối của F6P sau 24 giờ là 3,6g/L.

Ví dụ 2

Các thử nghiệm giống như trong ví dụ 1 (ngoài nhiệt độ phản ứng) được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C. Nhận thấy rằng 10g/L tinh bột hòa tan tạo ra 0,9g/L F6P ở nhiệt độ 40°C và 3,6g/L F6P ở nhiệt độ 80°C sau 40 giờ phản ứng. Các kết quả này gợi ý rằng việc tăng nhiệt độ phản ứng đối với nhóm enzym này đã làm tăng hiệu suất F6P, tuy nhiên nhiệt độ quá cao có thể làm giảm phần nào hoạt tính enzym.

Ví dụ 3

Nhận thấy rằng, ở nhiệt độ 80°C, tỷ lệ enzym của αGP : PGM: PGI xấp xỉ 1:1:1 đã dẫn đến sự tổng hợp F6P nhanh. Cần lưu ý là tỷ lệ enzym không làm ảnh hưởng nhiều đến nồng độ F6P cuối nếu thời gian phản ứng đủ lâu. Tuy nhiên, tỷ lệ enzym cũng tác động đến tốc độ phản ứng và tổng chi phí của các enzym được sử dụng trong hệ phản ứng.

Ví dụ 4

0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa 10g/L maltodextrin, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, $ZnCl_2$ 0,5mM, αGP 0,01U, PGM 0,01U, và PGI 0,01U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Phản ứng được dừng bằng cách lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, fructoza 6-phosphat (F6P), được xác định bằng thử nghiệm enzym kết hợp fructoza 6-phosphat kinaza

(F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD) trong đó mức hấp thụ ở bước sóng 340nm giảm chứng tỏ có sự tổng hợp F6P như được mô tả trên đây. Nồng độ cuối của F6P sau 24 giờ là 3,6g/L.

Ví dụ 5

Để thử nghiệm sự tổng hợp F6P từ Avicel, Sigma xenlulaza được sử dụng để thủy phân xenluloza ở nhiệt độ 50°C. Để loại bỏ beta-glucosidaza khỏi xenlulaza mua trên thị trường, 10 đơn vị hoạt tính enzym thủy phân giấy lọc/mL của xenlulaza được trộn với 10g/L Avicel trong bể nước đá trong 10 phút. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được lắng gạn. Avicel mà được gắn kết với xenlulaza chứa endoglucanaza và xenlobiohydrolaza được tái huyền phù trong dung dịch đệm xitrat (pH 4,8) để thủy phân ở nhiệt độ 50°C trong ba ngày. Sản phẩm thủy phân xenluloza được trộn với 5U/mL xenlodextrin phosphorylaza, 5U/L xenlobioza phosphorylaza, 5U/mL α GP, 5U/mL PGM, và 5U/mL PGI trong dung dịch đệm HEPES 100mM (pH 7,2) chứa phosphat 10mM, $MgCl_2$ 5mM và $ZnCl_2$ 0,5mM. Phản ứng này được tiến hành ở nhiệt độ 60°C trong 72 giờ và nhận thấy F6P có nồng độ cao (một lượng nhỏ glucoza và không có xenlobioza). F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym kết hợp được mô tả trên đây. Glucoza được phát hiện bằng cách sử dụng kit thử nghiệm hexokinaza/G6PDH như được mô tả trên đây.

Ví dụ 6

Để làm tăng hiệu suất F6P từ Avicel, Avicel được xử lý xơ bộ bằng axit phosphoric đậm đặc để tổng hợp xenluloza vô định hình (RAC), như được mô tả trong tài liệu của Zhang và các đồng tác giả *A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure*. Biomacromolecules 2006; 7:644-648. Để loại bỏ beta-glucosidaza ra khỏi xenlulaza mua trên thị trường, 10 đơn vị hoạt tính enzym thủy phân giấy lọc/mL của xenlulaza được trộn với 10g/L RAC trong bể nước đá trong 5 phút. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được lắng gạn. RAC mà được gắn kết với xenlulaza chứa endoglucanaza và xenlobiohydrolaza được tái huyền phù trong dung dịch đệm xitrat (pH 4,8) để thủy phân ở nhiệt độ 50°C trong 12 giờ. Sản phẩm thủy phân RAC được trộn với 5U/mL xenlodextrin phosphorylaza, 5U/L xenlobioza phosphorylaza, 5U/mL α GP, 5U/mL PGM, và 5U/mL PGI trong dung dịch đệm HEPES 100mM (pH 7,2) chứa phosphat 10mM, $MgCl_2$ 5mM và $ZnCl_2$ 0,5mM. Phản ứng được

tiến hành ở nhiệt độ 60°C trong 72 giờ. F6P và glucoza được thu hồi với nồng độ cao vì enzym không được bổ sung để chuyển hóa glucoza thành F6P. F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym kết hợp được mô tả trên đây. Glucoza được phát hiện bằng cách sử dụng kit thử nghiệm hexokinaza/G6PDH như được mô tả trên đây.

Ví dụ 7

Để làm tăng thêm hiệu suất F6P từ RAC, polyphosphat glucokinaza và polyphosphat được bổ sung. Để loại bỏ beta-glucosidaza ra khỏi xenlulaza mua trên thị trường, 10 đơn vị hoạt tính enzym thủy phân giấy lọc/mL của xenlulaza được trộn với 10g/L RAC trong bể nước đá trong 5 phút. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được lắng gạn. RAC mà được gắn kết với xenlulaza chứa endoglucanaza và xenlobiohydrolaza được tái huyền phù trong dung dịch đệm xitrat (pH 4,8) để thủy phân ở nhiệt độ 50°C được ủ trong dung dịch đệm xitrat (pH 4,8) để thủy phân ở nhiệt độ 50°C trong 12 giờ. Sản phẩm thủy phân RAC được trộn với 5U/mL polyphosphat glucokinaza, 5U/mL xenlodextrin phosphorylaza, 5U/mL xenlobioza phosphorylaza, 5U/mL α GP, 5U/mL PGM, và 5U/mL PGI trong dung dịch đệm HEPES 100mM (pH 7,2) chứa polyphosphat 50mM, phosphat 10mM, $MgCl_2$ 5mM và $ZnCl_2$ 0,5mM. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ. F6P được nhận thấy có nồng độ cao chỉ với một lượng nhỏ glucoza có mặt. F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym kết hợp được mô tả trên đây. Glucoza được phát hiện bằng cách sử dụng kit thử nghiệm hexokinaza/G6PDH như được mô tả trên đây.

Ví dụ 8

Để đánh giá sự tổng hợp tagatoza từ F6P, 2g/L F6P được trộn với 1U/ml fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE) và 1U/ml tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP) trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa $MgCl_2$ 5mM. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C. 100% F6P được chuyển hóa thành tagatoza được nhận thấy bằng HPLC (Agilent 1100 series) sử dụng cột Agilent Hi-Plex H và bộ phát hiện chỉ số khúc xạ. Mẫu được chạy trong dung dịch H_2SO_4 5mM ở tốc độ 0,6 mL/phút.

Ví dụ 9

Để đánh giá sự tổng hợp tagatoza từ maltodextrin, 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa 20g/L maltodextrin, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, α GP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, F6PE 0,05U, và T6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Phản ứng được dừng nhờ lọc enzyme bằng thiết bị cô Vivaspin 2

(10.000 MWCO). Tagatoza được phát hiện và được định lượng bằng Agilent 1100 series HPLC với bộ phát hiện chỉ số khúc xạ và cột Agilent Hi-Plex H. Pha động là H_2SO_4 5mM, mà chạy ở tốc độ 0,6mL/phút. Thu được hiệu suất 9,2g/L tagatoza. Hiệu suất này tương đương với 92% hiệu suất theo lý thuyết do các hạn chế về sự thoái biến maltodextrin mà không có enzym như isoamylaza hoặc 4-glucan transferaza. Tagatoza với các tiêu chuẩn nồng độ khác nhau được sử dụng để định lượng hiệu suất.

Ví dụ 10

Hỗn hợp phản ứng chứa 200g/L maltodextrin, dung dịch đệm axetat 10mM (pH 5,5), MgCl_2 5mM, và 0,1g/L isoamylaza được ủ ở nhiệt độ 80°C trong 24 giờ. Hỗn hợp này được sử dụng để tạo ra hỗn hợp phản ứng khác chứa 20g/L maltodextrin đã xử lý bằng isoamylaza, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl_2 5mM, αGP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, F6PE 0,05U, và T6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9. Hiệu suất của tagatoza được tăng đến 16g/L có xử lý sơ bộ maltodextrin bằng isoamylaza. Hiệu suất này tương đương với 80% hiệu suất theo lý thuyết.

Ví dụ 11

Để tăng thêm hiệu suất tagatoza từ maltodextrin, 4-glucan transferaza 0,05U (4GT) được bổ sung vào phản ứng được mô tả trong ví dụ 9.

0,2mL hỗn hợp phản ứng chứa 20g/L maltodextrin đã xử lý bằng isoamylaza (xem ví dụ 9), dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl_2 5mM, αGP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, F6PE 0,05U, T6PP 0,05U, và 4GT 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9. Hiệu suất của tagatoza được tăng lên đến 17,7g/L bằng cách bổ sung 4GT vào maltodextrin đã xử lý bằng IA. Hiệu suất này bằng 88,5% hiệu suất theo lý thuyết.

Ví dụ 12

Để xác định khoảng nồng độ của dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS), 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa 50g/L maltodextrin; dung dịch nước muối được đệm phosphat 6,25mM, 12,5mM, 25mM, 37,5mM, hoặc 50mM pH 7,2; MgCl_2 5mM; αGP 0,1U; PGM 0,1U; PGI 0,1U; F6PE 0,1U; và T6PP 0,1U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Thời gian phản ứng ngắn làm cho phản ứng không kết thúc, và do đó sự chênh lệch về hiệu suất có thể được thấy rõ ràng hơn. Sản lượng của tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9. Lần lượt thu được hiệu suất bằng 4,5g/L, 5,1g/L, 5,6g/L, 4,8g/L, hoặc

4,9g/L tagatoza của các phản ứng chứa dung dịch nước muối được đệm phosphat 6,25mM, 12,5mM, 25mM, 37,5mM, hoặc 50mM pH 7,2 (Bảng 1). Các kết quả này chỉ ra rằng nồng độ PBS 25mM pH 7,2 là lý tưởng cho các điều kiện phản ứng cụ thể. Quan trọng cần lưu ý là ngay cả khi sử dụng PBS 6,25mM ở pH 7,2 thì hiệu suất cao vẫn có thể đạt được do sự tái tuần hoàn của phosphat. Điều này chứng tỏ là phương pháp tái tuần hoàn phosphat đã bộc lộ có thể duy trì lượng phosphat thấp ngay cả ở mức hiệu suất thể tích trong công nghiệp (ví dụ, 200-300g/L maltodextrin).

Bảng 1

Nồng độ của PBS pH 7,2 (mM)	g/L Tagatoza
6,25	4,5
12,5	5,1
25	5,6
37,5	4,8
50	4,9

Ví dụ 13

Để xác định khoảng pH của phản ứng theo đợt, 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa 50g/L maltodextrin; dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0 7,2, hoặc 7,3; $MgCl_2$ 5mM; αGP 0,02 U; PGM 0,02U; PGI 0,02U; F6PE 0,02U; và T6PP 0,02U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 16 giờ. Các đơn vị được làm giảm để phản ứng không kết thúc, và do đó sự chênh lệch về hiệu suất có thể được thấy rõ ràng hơn. Sản lượng của tagatoza được định lượng như trong ví dụ 8. Lần lượt thu được hiệu suất 4,0g/L, 4,1g/L 4,2g/L, 4,1g/L, 4,4g/L, 4,1g/L, 3,8g/L hoặc 4,0g/L tagatoza của các phản ứng chứa dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM ở pH 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, hoặc 7,3 (Bảng 2). Các kết quả này chỉ ra rằng pH bằng 6,8 là lý tưởng cho các điều kiện phản ứng cụ thể, cho dù hệ phản ứng có thể hoạt động trong khoảng pH lớn hơn.

Bảng 2

pH của PBS	g/L của Tagatoza
6,0	4,0
6,2	4,1
6,4	4,2

6,6	4,1
6,8	4,4
7,0	4,1
7,2	3,8
7,3	4,0

Ví dụ 14

Để nghiên cứu quy mô lớn, 20mL hỗn hợp phản ứng chứa 50g/L maltodextrin đã xử lý bằng isoamylaza (xem ví dụ 9), dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, α GP 10U, PGM 10U, PGI 10U, F6PE 10U, và T6PP 10U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 8. Hiệu suất của tagatoza là 37,6g/L ở quy mô 20mL và 50g/L maltodextrin. Hiệu suất này tương đương với 75% hiệu suất theo lý thuyết. Các kết quả này chỉ ra rằng quy mô sản xuất với thể tích phản ứng lớn hơn sẽ không làm mất hiệu suất đáng kể.

Ví dụ 15

Để làm tăng thêm hiệu suất tagatoza từ maltodextrin, maltoza phosphorylaza 0,05U được bổ sung vào phản ứng được mô tả trong ví dụ 9.

Ví dụ 16

Để làm tăng thêm hiệu suất tagatoza từ maltodextrin, polyphosphat glucokinaza 0,05U và polyphosphat 75mM được bổ sung vào phản ứng được mô tả trong ví dụ 9.

Ví dụ 17

Để sản xuất tagatoza từ fructoza, hỗn hợp phản ứng chứa 10g/L fructoza, dung dịch đệm Tris 50mM pH 7,0, polyphosphat 75mM, $MgCl_2$ 5mM, fructoza polyphosphat kinaza 0,05U, F6PE 0,05U, và T6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 18

Để sản xuất tagatoza từ glucoza, hỗn hợp phản ứng chứa 10g/L glucoza, dung dịch đệm Tris 50mM pH 7,0, polyphosphat 75mM, $MgCl_2$ 5mM, glucoza polyphosphat kinaza 0,05U, PGI 0,05U, F6PE 0,05U, và T6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 19

Để sản xuất tagatoza từ sucroza, hỗn hợp phản ứng chứa 10g/L sucroza, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,0, MgCl_2 5mM, sucroza phosphorylaza 0,05U, PGM 0,05, PGI 0,05U, F6PE 0,05U, và T6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 20

Để làm tăng thêm hiệu suất của tagatoza từ sucroza, polyphosphat 75mM và polyphosphat fructokinaza 0,05 được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong ví dụ 15. Sản lượng tagatoza được định lượng như trong ví dụ 9.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất tagatoza bằng enzym, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - (i) chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành tagatoza 6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE); và
 - (ii) chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza được xúc tác bởi tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP);
 trong đó, các bước (i) và (ii) được tiến hành trong một bình phản ứng và trong đó các bước của quy trình không cần ATP.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa glucoza 6-phosphat (G6P) thành F6P, trong đó bước này được xúc tác bởi phosphoglucoza isomeraza (PGI).
3. Quy trình theo điểm 2, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa glucoza 1-phosphat (G1P) thành G6P, trong đó bước này được xúc tác bởi phosphoglucomutaza (PGM).
4. Quy trình theo điểm 3, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa sacarit thành G1P, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym, trong đó sacarit được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất tinh bột, tinh bột, xenluloza hoặc dẫn xuất của nó và sucroza.
5. Quy trình theo điểm 4, trong đó ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm alpha-glucan phosphorylaza (α GP), maltoza phosphorylaza, sucroza phosphorylaza, xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza, và xenluloza phosphorylaza.
6. Quy trình theo điểm 4, trong đó sacarit là dẫn xuất tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloza, amylopectin, tinh bột hòa tan, tinh bột, amylodextrin, maltodextrin, maltoza, và glucoza.

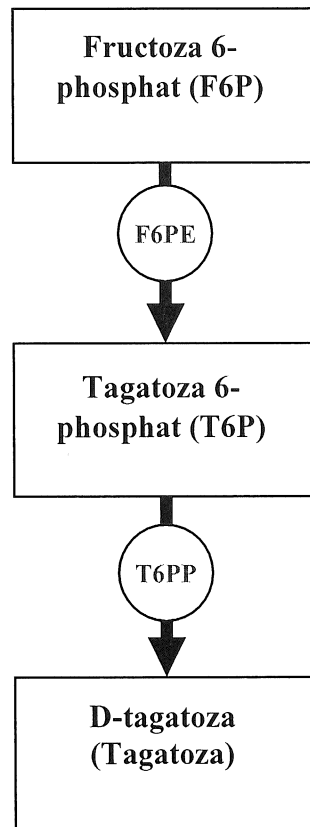
7. Quy trình theo điểm 4 hoặc điểm 6, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa tinh bột thành dẫn xuất tinh bột trong đó dẫn xuất tinh bột được điều chế bằng cách thủy phân tinh bột bằng enzym hoặc thủy phân tinh bột bằng axit.
8. Quy trình theo điểm 6, trong đó 4-glucan transferaza (4GT) được bổ sung vào quy trình.
9. Quy trình theo điểm 7, trong đó dẫn xuất tinh bột được điều chế bằng cách thủy phân tinh bột bằng enzym được xúc tác bởi isoamylaza, pullulanaza, alpha-amylaza, hoặc hỗn hợp của chúng.
10. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm:
bước chuyển hóa fructoza thành F6P, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym.
11. Quy trình theo điểm 2, trong đó quy trình này còn bao gồm:
bước chuyển hóa glucoza thành G6P, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym.
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó fructoza 6-phosphat epimeraza được khác biệt ở chỗ: nó được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 60% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, hoặc 10; hoặc nó bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 60% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, hoặc 11.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó tagatoza 6-phosphat phosphataza được khác biệt ở chỗ: nó được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 60% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 12, 14, hoặc 16; hoặc nó bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 60% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 13, 15 hoặc 17.

14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó các bước của quy trình được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37°C đến 85°C, ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, và/hoặc trong khoảng thời gian từ 8 giờ đến 48 giờ; và/hoặc không cần NAD(H), ở nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 150mM, phosphat được tái tuần hoàn, và/hoặc ít nhất một bước của quy trình bao gồm phản ứng hóa học có lợi về mặt năng lượng.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó quy trình này là quy trình sản xuất tagatoza từ dẫn xuất tinh bột bằng enzym, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - (i) chuyển hóa sacarit thành glucoza 1-phosphat (G1P) nhờ alpha-glucon phosphorylaza (α GP), trong đó sacarit được chọn từ một hoặc nhiều dẫn xuất của tinh bột;
 - (ii) chuyển hóa G1P thành glucoza 6-phosphat (G6P) nhờ phosphoglucomutaza (PGM);
 - (iii) chuyển hóa G6P thành fructoza 6-phosphat (F6P) nhờ phosphoglucoisomeraza (PGI);
 - (iv) chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành tagatoza 6-phosphat (T6P) được xúc tác bởi fructoza 6-phosphat epimeraza (F6PE); và
 - (v) chuyển hóa T6P sinh ra thành tagatoza được xúc tác bởi tagatoza 6-phosphat phosphataza (T6PP),
 trong đó các bước (i)-(v) được tiến hành trong một bình phản ứng.

16. Quy trình theo điểm 10, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa sucroza thành fructoza, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

17. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa sucroza thành glucoza, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

**FIG.1**

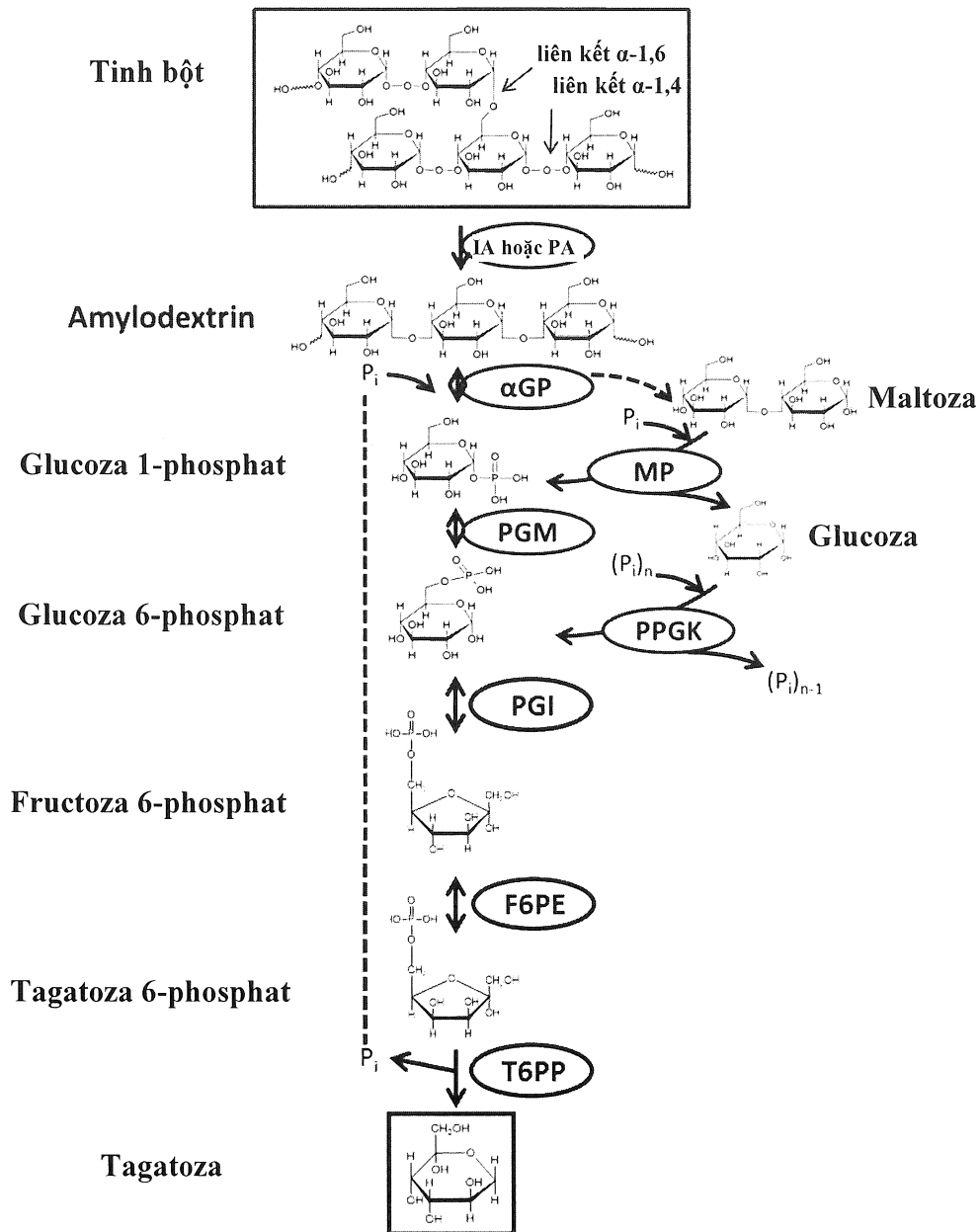


FIG. 2

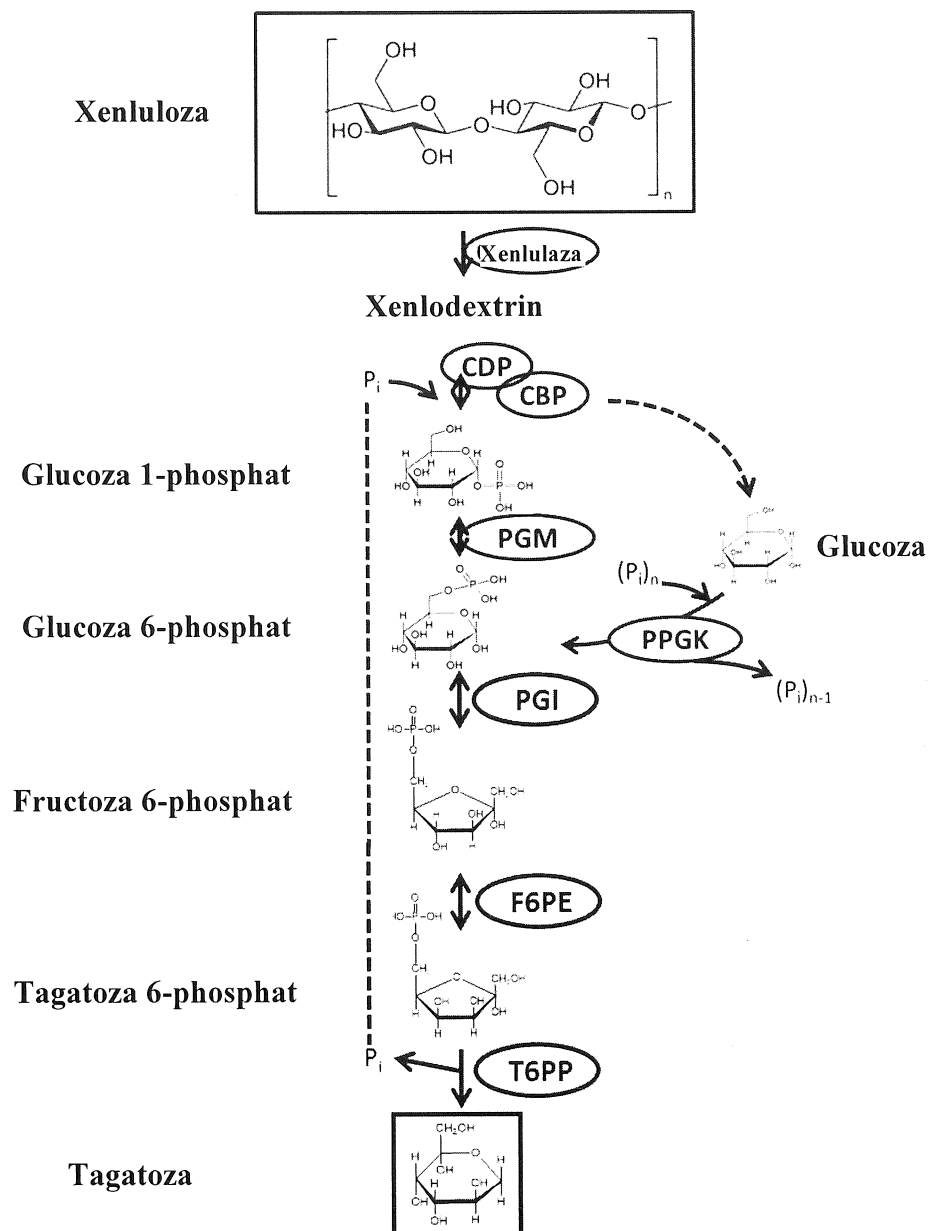


FIG. 3

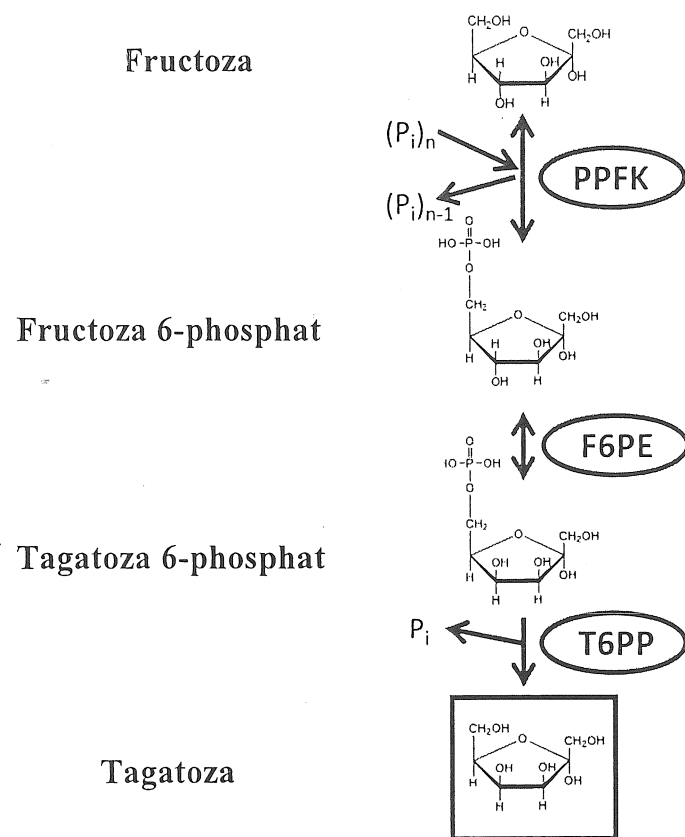


FIG. 4

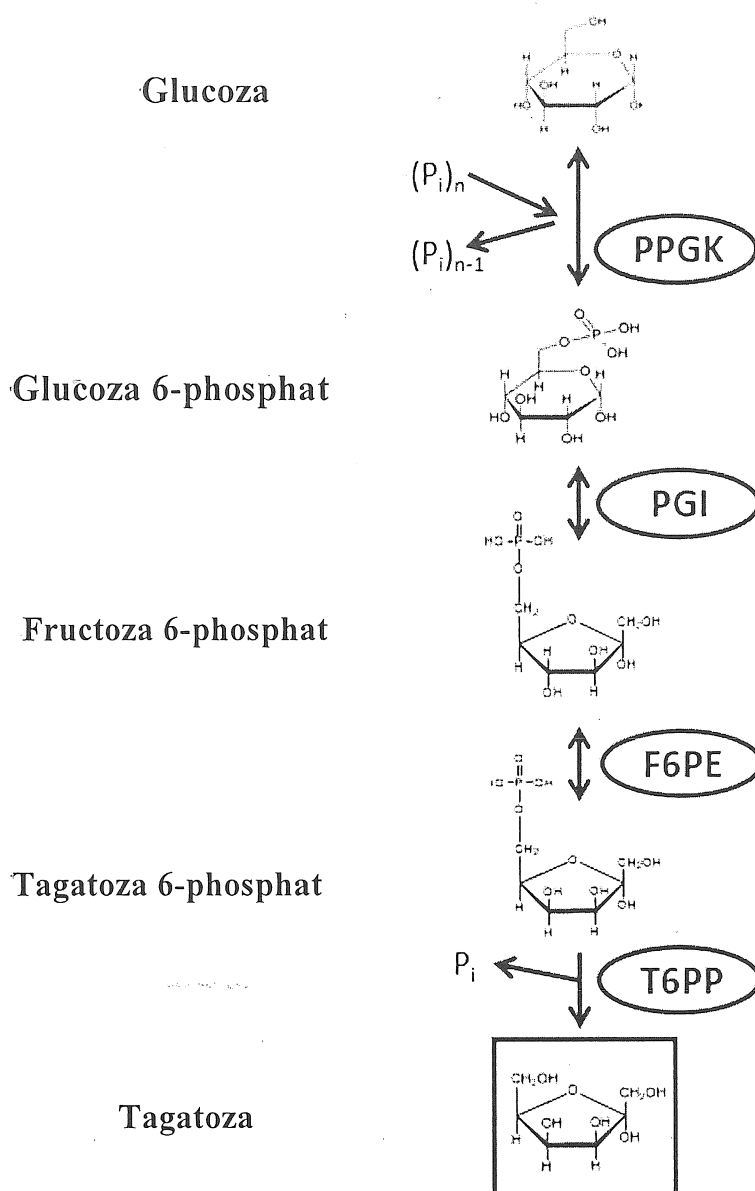


FIG. 5

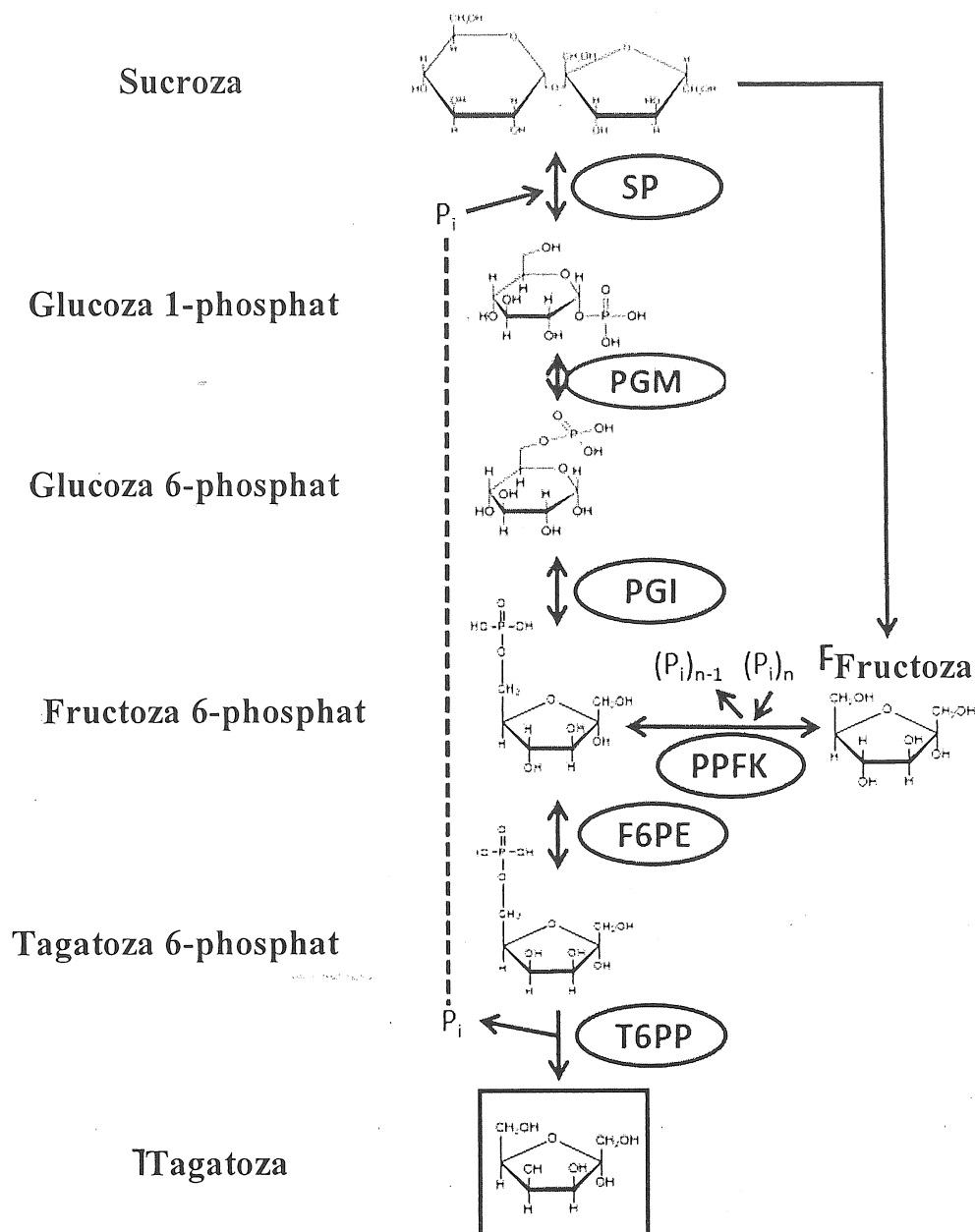


FIG. 6

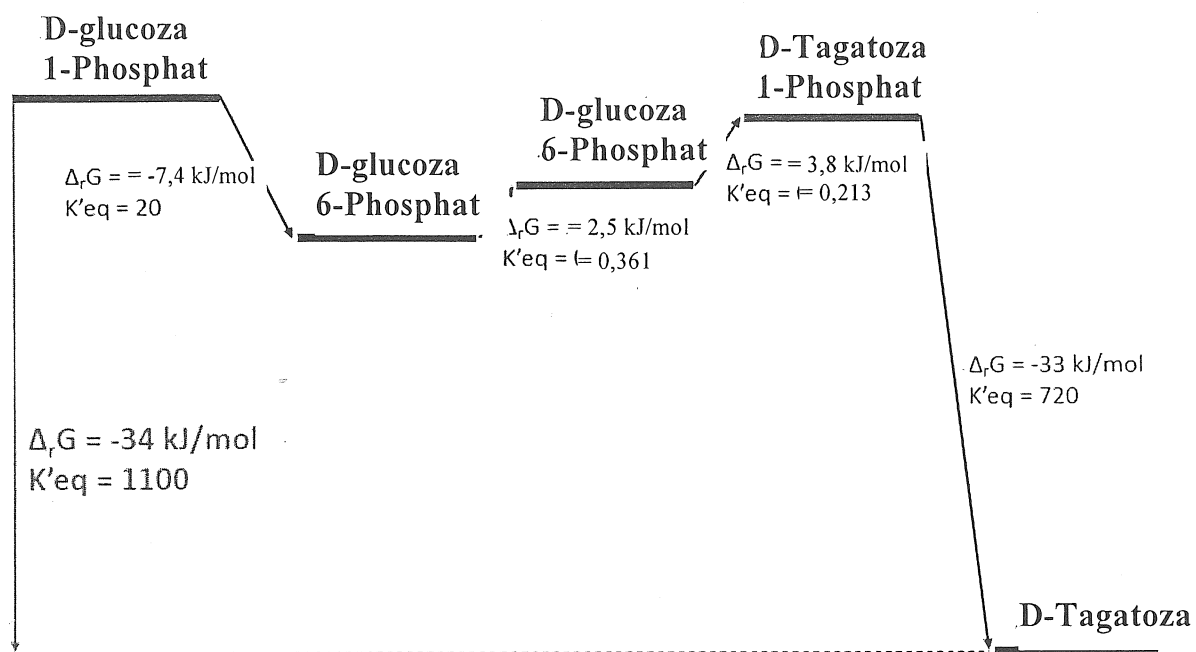


FIG. 7