



(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)



1-0039000

(51)⁷ C12P 19/24; C07H 3/02; C12N 9/10; (13) B
C12N 9/90; C12P 19/02; C07H 1/00;
C12N 9/16

(21) 1-2019-03662

(22) 14/12/2017

(86) PCT/US2017/066298 14/12/2017

(87) WO/2018/112139 21/06/2018

(30) 62/434,033 14/12/2016 US

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/09/2019 378A

(73) BONUMOSE LLC (US)

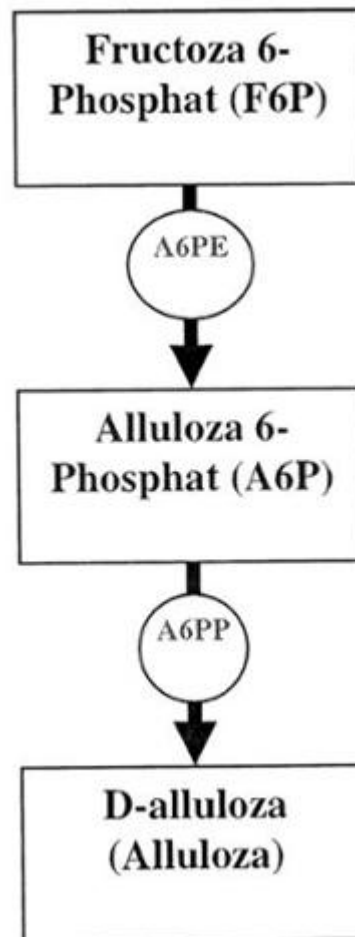
1725 Discovery Drive, Suite 220, Charlottesville, VA 22911, United States of America

(72) WICHELECKI, Daniel, Joseph (US); ROGERS, Edwin, O. (US).

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

(54) QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ ALLULOZA

(57) Sáng chế đề xuất quy trình chuyển hóa sacarit thành alluloza nhờ enzym. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế alluloza, trong đó quy trình này bao gồm chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành alluloza 6-phosphat (A6P), được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat 3-epimeraza (A6PE), và chuyển hóa A6P thành alluloza, được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat phosphataza (A6PP).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế đường D-alluloza. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế D-alluloza bằng cách chuyển hóa sacarit bằng enzym (ví dụ, polysacarit, oligosacarit, disacarit, sucroza, D-glucoza, và D-fructoza) thành D-alluloza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

D-alluloza (cũng được biết đến là D-psicoza) (sau đây gọi là alluloza) là một chất làm ngọt tự nhiên, có hàm lượng calo thấp có độ ngọt bằng 70% độ ngọt của sucroza, song chỉ có 10% lượng calo. D-alluloza là một monosacarit hexoza có nguồn gốc trong tự nhiên mà chỉ chiếm một lượng nhỏ ở lúa mỳ và các loại thực vật khác. Alluloza đã được chấp nhận là một chất phụ gia thực phẩm bởi Cục dược và thực phẩm (Food and Drug Administration-FDA) vào năm 2012, Cục này đã chỉ rõ alluloza nói chung được cho là an toàn (generally recognized as safe-GRAS). Tuy nhiên, do giá bán alluloza cao, nên việc sử dụng nó làm chất làm ngọt bị hạn chế. Alluloza có vô số các lợi ích về mặt sức khỏe: nó có hàm lượng calo thấp (10% sucroza); có chỉ số đường huyết rất thấp bằng 1; được hấp thu hoàn toàn ở ruột non nhưng không bị chuyển hóa thay vào đó được bài tiết ra nước tiểu và phân; giúp điều hòa lượng đường huyết bằng cách ức chế alpha-amylaza, sucraza và maltaza; và có các chức năng tương tự như sucroza trong thực phẩm và đồ uống. Vì thế rõ ràng alluloza có nhiều ứng dụng trong ngành thực phẩm và đồ uống.

Hiện alluloza được sản xuất chủ yếu bằng cách đồng phân hóa fructoza bằng enzym (công bố đơn quốc tế số WO 2014049373). Nói chung, phương pháp này không thích hợp vì chi phí nguyên liệu cao, việc tách alluloza khỏi fructoza tốn kém, và hiệu suất sản xuất tương đối thấp.

Cần phát triển con đường tổng hợp hiệu quả về mặt chi phí để sản xuất alluloza với hiệu suất cao trong đó ít nhất một bước của quy trình có liên quan đến phản ứng hóa học tiết kiệm năng lượng. Hơn nữa, cần một quy trình sản xuất trong đó các bước của quy trình có thể được tiến hành trong một thùng hoặc bình phản

ứng sinh học. Cũng cần quy trình sản xuất alluloza mà có thể được tiến hành ở nồng độ phosphat tương đối thấp, trong đó phosphat có thể được tái chế, và/hoặc quy trình này không cần sử dụng adenosin triphosphat (ATP) làm nguồn phosphat. Cũng cần con đường sản xuất alluloza mà không cần sử dụng coenzym nicotinamit adenosin dinucleotit (NAD(H)) tồn kém ở bước bất kỳ trong số các bước phản ứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được mô tả ở đây đề cập đến quy trình sản xuất alluloza. Theo các khía cạnh khác, quy trình này bao gồm bước chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành alluloza 6-phosphat (A6P), được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat 3-epimeraza (A6PE); và chuyển hóa A6P thành alluloza, được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat phosphataza (A6PP). Sáng chế cũng đề cập đến alluloza được điều chế bằng quy trình bất kỳ trong số các quy trình được mô tả ở đây.

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

Theo các khía cạnh khác, quy trình điều chế alluloza 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 phosphoglucoisomeraza (PGI); chuyển hóa F6P thành alluloza 6-phosphat (A6P), được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thu được thành alluloza, được xúc tác bởi A6PP.

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 điều chế alluloza bao gồm chuyển hóa tinh bột thành dẫn xuất tinh bột bằng cách thủy phân bằng enzym hoặc thủy phân tinh bột bằng axit. Theo các khía cạnh khác, dẫn xuất tinh bột có thể được điều chế bằng

cách thủy phân tinh bột bằng enzym được xúc tác bởi isoamylaza, pullulanaza, alpha-amylaza, hoặc hỗn hợp hai hoặc nhiều trong số các enzym này. Quy trình điều chế alluloza, theo các khía cạnh nhất định, cũng có thể bao gồm bổ sung 4-glucan transferaza (4GT).

Theo các khía cạnh khác, quy trình điều chế alluloza có thể bao gồm chuyển hóa fructoza thành F6P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym; chuyển hóa F6P thành alluloza 6-phosphat (A6P) được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thu được thành alluloza, được xúc tác bởi A6PP. Theo các phương án khác, quy trình sản xuất alluloza 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 alluloza 6-phosphat (A6P) được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thu được thành alluloza, được xúc tác bởi A6PP.

Theo các khía cạnh khác của sáng chế, G6P được sử dụng trong quy trình điều chế alluloza có thể được tạo ra bằng cách chuyển hóa glucoza thành G6P, được xúc tác bởi ít nhất một enzym. Nói cách khác glucoza có thể được tổng hợp bằng cách chuyển hóa sucroza thành glucoza, được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

Theo các khía cạnh khác của sáng chế, các bước của quy trình điều chế alluloza được tiến hành không cần ATP, không cần NAD(H), ở nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 0mM đến 150mM, phosphat này được tái chế, và/hoặc ít nhất một bước của quy trình có liên quan đến phản ứng hóa học tiết kiệm năng lượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ này minh họa các khía cạnh nhất định của một vài phương án theo sáng chế, và không nên được sử dụng để 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 alluloza 6-phosphat và sau đó thành alluloza.

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

FIG.3 thể hiện con đường chuyển hóa bằng enzym xenluloza hoặc sản phẩm dẫn xuất của nó thành alluloza. CDP, xenlodextrin phosphorylaza; CBP, xenlobioza phosphorylaza; PPGK, polyphosphat glucokinaza; PGM, phosphoglucomutaza; PGI, phosphoglucoisomeraza.

FIG.4 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym fructoza thành alluloza. PPFK, polyphosphat fructokinaza.

FIG.5 là sơ đồ minh họa con đường chuyển hóa bằng enzym glucoza thành alluloza. PPGK, polyphosphat glucokinaza; PGI, phosphoglucoisomeraza.

FIG.6 thể hiện con đường chuyển hóa bằng enzym sucroza hoặc sản phẩm dẫn xuất của nó thành alluloza. SP, sucroza phosphorylaza; PPFK, polyphosphat fructokinaza; PGM, phosphoglucomutaza; PGI, phosphoglucoisomeraza.

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

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất con đường sử dụng enzym, hoặc các quy trình, để tổng hợp alluloza với hiệu suất sản phẩm cao, đồng thời làm giảm đáng kể chi phí tách sản phẩm và chi phí sản xuất alluloza.

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế alluloza, trong đó quy trình này bao gồm chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành alluloza 6-phosphat (A6P) được xúc tác bởi epimeraza và chuyển hóa A6P thu được thành alluloza được xúc tác bởi phosphataza (ví dụ, alluloza 6-phosphat phosphataza, A6PP). Nói chung, quy trình này được thể hiện trên FIG.1. Theo các phương án nhất định, epimeraza xúc tác cho sự chuyển hóa F6P thành A6P là alluloza 6-phosphat 3-epimeraza (A6PE).

Epimeraza chuyển hóa F6P thành A6P có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế. Epimeraza cũng có khả năng chuyển hóa A6P thành F6P. Theo một vài khía cạnh của sáng chế, epimeraza thích hợp để sử dụng trong quy trình để chuyển hóa F6P thành A6P có trình tự axit amin mà có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs.: 3 hoặc 6, ít nhất là 45%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 55%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa 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%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, tốt nhất ít nhất là 95%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96, 97, 98, 99 hoặc 100%. Epimeraza thích hợp được mã hóa bởi polynucleotit có trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NOS.: 1, 2, 4, và 5; ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 35%, tốt hơn nữa ít nhất là 40%, tốt hơn nữa ít nhất là 45%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 55%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa 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%.

Ví dụ về A6PE bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein sau, được xác định bởi các số ID UNIPROT: D9TQJ4, A0A090IXZ8, và P32719. Trong số này, D9TQJ4 và A0A090IXZ8 là thu được từ các sinh vật ưa nhiệt. P32719 thu được từ sinh vật ưa ấm. P32719 giống 53% so với A0A090IXZ8 và giống 55% so với D9TQJ4, và mỗi protein xúc tác cho quá trình epime hóa F6P thành A6P. Hơn nữa, A0A090IXZ8 giống 45% so với D9TQJ4. Ngược lại, các protein epimeraza khác được xác định bởi các số ID UNIPROT: A0A101D823, R1AXD6, A0A150LBU8, A0A023CQG9, và H1XWY2, mà có mức đồng nhất với D9TQJ4 bằng 45% hoặc ít hơn không xúc tác cho quá trình epime hóa F6P thành A6P.

Theo một vài khía cạnh của sáng chế, epimeraza thích hợp để sử dụng trong quy trình để chuyển hóa F6P thành A6P sử dụng các đồng yếu tố kim loại có hóa trị hai: tốt hơn nữa, nhưng không chỉ giới hạn ở, coban. Theo các khía cạnh khác của sáng chế epimeraza chứa nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa vùng ống (α/β)₈ để xúc tác; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở chứa vùng gắn kết với phosphat bao gồm Ser ở đầu của dải β thứ 7 của vùng ống, Ser ở đầu dải β thứ 8 của vùng ống, và Gly ở vị trí có hoạt tính của vòng; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa vùng gắn kết với kim loại bao gồm His ở các dải thứ hai và thứ ba của vùng ống; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa Asp ở dải β thứ 2 và thứ bảy của vùng ống để hoạt động như là chất xúc tác axit/bazơ để vận chuyển proton ở vị trí 1,1, và ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa ký hiệu gốc Asp kỵ nước có

đuôi His trong dải β thứ hai của vùng ống trong đó His được sử dụng để liên kết với kim loại và Asp được dùng để xúc tác nhờ axit/bazơ. Các ký hiệu này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được viện dẫn trong tài liệu, ví dụ, Chan *et al.*, Structural Basis for Substrate Specificity in Phosphate Binding (beta/alpha)₈-Barrels: D-alluloza 6-Phosphat 3-Epimeraza from Escherichia coli K-12. Biochemistry. 2008; 47 (36); 9608 – 9617. Tốt hơn nữa, epimeraza dùng trong quy trình theo sáng chế chứa vùng ống (α/β)₈ để xúc tác, Ser ở đầu của dải β thứ 7 của vùng ống, Ser ở đầu của dải β thứ 8 của vùng ống, Gly ở vòng vị trí hoạt tính, His ở dải β thứ hai và thứ ba của vùng ống, Asp ở dải β thứ hai và thứ 7 của vùng ống, và ký hiệu gốc Asp kị nước có đuôi His trong dải β thứ hai của vùng ống.

Quy trình theo sáng chế sử dụng phosphataza để chuyển hóa A6P thành alluloza (D-alluloza). Theo một vài khía cạnh của sáng chế, phosphataza thích hợp cho quy trình chuyển hóa A6P thành alluloza có trình tự axit amin mà có mức đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.: 9, ít nhất là 45%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 55%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa 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%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, và thậm chí tốt nhất ít nhất là 96, 97, 98, 99 hoặc 100%. Các epimeraza thích hợp được mã hóa bởi polynucleotit có trình tự nucleotit có mức đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NOS.: 7 và 8; ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 35%, tốt hơn nữa ít nhất là 40%, tốt hơn nữa ít nhất là 45%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 55%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa 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%.

Ví dụ về A6PP bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein sau, được xác định bởi các số ID UNIPROT: A3DC21, Q5LGR4, và Q89ZR1. A3DC21 đồng nhất 46% với Q5LGR4 và đồng nhất 45% với Q89ZR1, và mỗi protein xúc tác cho việc loại phosphoryl đặc hiệu của phản ứng chuyển hóa A6P thành alluloza. Ngược lại, các phosphataza khác có nguồn gốc từ siêu họ haloaxit dehydrogenaza, protein

được xác định bởi các số ID UNIPROT: H0UQ29, Q67LU4, A0A0K6IPM3, C8WSJ0, A0A151YX61, và các chỉ số khác, mà đồng nhất ít hơn 45% so với A3DC21 không xúc tác cho việc loại phosphoryl đặc hiệu của phản ứng chuyển hóa A6P thành alluloza.

Phosphatase chuyển hóa A6P thành alluloza, thích hợp để sử dụng trong quy trình theo sáng chế là đặc hiệu với alluloza 6-phosphat. Như được sử dụng ở đây, đặc hiệu với alluloza 6-phosphat có nghĩa là có hoạt tính đặc hiệu cao hơn trên alluloza 6-phosphat so với glucoza 1-phosphat, glucoza 6-phosphat, hoặc fructoza 6-phosphat.

Phosphatase chuyển hóa A6P thành alluloza sử dụng đồng yếu tố kim loại hóa trị hai: tốt hơn là magie. Theo các khía cạnh khác của sáng chế phosphatase chứa nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa vùng gấp Rossmannoid để xúc tác; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa vùng mũ C1 đặc hiệu với cơ chất; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa ký hiệu DxD ở dải β thứ nhất của vùng gấp Rossmannoid để phối hợp với magie, trong đó Asp thứ hai là chất xúc tác axit/bazơ nói chung; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa Thr hoặc Ser ở đầu của dải β thứ hai của vùng gấp Rossmannoid mà giúp làm ổn định các chất trung gian phản ứng; ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa Lys ở đầu N của vòng xoắn α , ở đầu C so với dải β thứ ba của vùng gấp Rossmannoid mà giúp làm ổn định các chất trung gian của phản ứng; và ngoài ra nhưng không chỉ giới hạn ở việc chứa ký hiệu GDxxxD ở đầu của dải β thứ tư của vùng gấp Rossmannoid để phối hợp magie. Các đặc điểm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là được viện dẫn trong tài liệu, ví dụ, Burroughs *et al.*, Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases và Allied Enzymes. J. Mol. Biol. 2006; 361; 1003–1034. Tốt hơn nữa, phosphatase chuyển hóa A6P thành alluloza được sử dụng trong quy trình theo sáng chế chứa vùng gấp Rossmannoid để xúc tác, vùng mũ C1, ký hiệu DxD trong dải β thứ nhất của vùng gấp Rossmannoid, Thr hoặc Ser ở đầu của dải β thứ hai của vùng gấp Rossmannoid, Lys ở đầu N của vòng xoắn α , ở đầu C so với dải β thứ ba của vùng gấp Rossmannoid, và ký hiệu GDxxxD ở đầu của dải β thứ tư của vùng gấp Rossmannoid.

Theo một vài phương án, quy trình điều chế alluloza theo sáng chế cũng bao gồm bước chuyển hóa bằng enzym glucoza 6-phosphat (G6P) thành F6P, và bước này được xúc tác bởi phosphoglucoisomeraza (PGI). Theo các phương án khác, ngoài ra quy trình điều chế alluloza 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 alluloza cũng bao gồm bước chuyển hóa sacarit thành G1P mà được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

Do đó, quy trình điều chế alluloza theo sáng chế có thể, ví dụ, bao gồm các bước sau: (i) chuyển hóa sacarit thành glucoza 1-phosphat (G1P) sử dụng một hoặc nhiều enzym; (ii) chuyển hóa G1P thành G6P sử dụng phosphoglucomutaza (PGM, EC 5.4.2.2); (iii) chuyển hóa G6P thành F6P sử dụng phosphoglucoisomeraza (PGI, EC 5.3.1.9); (iv) chuyển hóa F6P thành A6P nhờ A6PE, và (v) chuyển hóa A6P thành alluloza nhờ A6PP. Ví dụ về quy trình này trong đó sacarit là tinh bột được thể hiện trên FIG.2.

Thông thường, tỷ lệ các đơn vị enzym được sử dụng trong quy trình được mô tả là 1:1:1:1:1 (α GP:PGM:PGI:A6PE:A6PP). Để tối ưu hóa hiệu suất sản phẩm, các tỷ lệ này có thể được điều chỉnh trong một số dạng kết hợp. Ví dụ, tỷ lệ 3:1:1:1:1 có thể được sử dụng để tối đa hóa nồng độ của các chất trung gian được phosphoryl hóa, mà sẽ dẫn đến làm tăng hoạt tính của các phản ứng phía sau. Ngược lại, tỷ lệ 1:1:1:1:3 có thể được sử dụng để duy trì nguồn cung lớn phosphat cho α GP, mà sẽ dẫn đến việc phân cắt các liên kết alpha-1,4-glycosidic nhờ phân giải phospho 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 bàn luận dưới đây, có thể thay đổi để làm tăng hiệu suất tổng hợp alluloza. Ví dụ, enzym cụ thể có thể có mặt với lượng bằng khoảng 2, 3, 4, 5 lần, v.v. so với lượng của các enzym khác.

Một ưu điểm quan trọng của các quy trình 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 mà được bố trí nối tiếp nhau.

Ion phosphat được tạo ra bởi quá trình loại phosphoryl của A6P sau đó có thể được tái chế trong bước chuyển hóa sacarit thành G1P của quy trình, cụ thể là khi tất cả các bước của quy trình được tiến hành trong một bình phản ứng sinh học hoặc bình phản ứng. Khả năng tái chế phosphat trong các quy trình được mô tả cho phép lượng phosphat không tỷ lệ được sử dụng, mà duy trì nồng độ phosphat trong phản ứng thấp. Điều này làm ảnh hưởng đến toàn bộ quy trình và toàn bộ tốc độ của quy trình, nhưng không làm giới hạn hoạt tính của từng enzym và cho phép quy trình sản xuất alluloza thu được hiệu quả hoàn toàn.

Ví dụ, nồng độ phosphat dùng trong phản ứng có thể nằm trong khoảng từ 0mM đến 300mM, từ 0mM đến 150mM, từ 1mM đến 50mM, tốt hơn nữa từ 5mM đến 50mM, hoặc tốt hơn nữa là từ 10mM đến 50mM. Ví dụ, nồng độ phosphat dùng 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 giúp làm giảm chi phí sản xuất do tổng lượng phosphat thấp và do đó làm giảm chi phí loại phosphat. Điều này cũng giúp ngăn ngừa tình trạng ức chế A6PP khi nồng độ phosphat tự do cao và làm giảm khả năng ô nhiễm do phosphat.

Hơn nữa, quy trình được mô tả ở đây có thể được tiến hành mà không cần bổ sung ATP làm nguồn phosphat, *tức là*, không cần ATP. Các quy trình này cũng có thể được tiến hành mà không cần bổ sung NAD(H), *tức là*, không cần NAD(H). Các ưu điểm khác cũng bao gồm thực tế là ít nhất một bước của các quy trình sản xuất alluloza được mô tả có liên quan đến phản ứng hóa học tiết kiệm năng lượng (FIG.7).

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 mà cũng có thể bao gồm maltodextrin phosphorylaza, tinh bột phosphorylaza, glycogen phosphorylaza, và các phosphorylaza phân hủy liên kết α -1,4 glycosidic khác), 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 hoặc hỗn hợp enzym tùy thuộc vào sacarit được sử dụng trong quy trình này.

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 rộng rãi nhất trong tự nhiên và chủ yếu có trong các loại hạt của thực vật. Tinh bột tự nhiên chứa amyloza mạch thẳng và amylopectin mạch nhánh. Ví dụ về các dẫn xuất của tinh bột bao gồm amyloza, amylopectin, tinh bột hòa tan, amylopectin, maltodextrin, maltoza, fructoza, và glucoza. Ví dụ về các dẫn xuất của xenluloza bao gồm sinh khối đã xử lý sơ bộ, xenluloza tái sinh vô định hình, xenlopectin, xenlobioza, fructoza, và glucoza. Các dẫn xuất sucroza bao gồm fructoza và glucoza.

Các dẫn xuất của tinh bột có thể được điều chế bằng cách thủy phân tinh bột bằng enzym hoặc thủy phân tinh bột bằng axit. Cụ thể là, thủy phân tinh bột bằng enzym có thể được xúc tác hoặc được thúc đẩy bằng isoamylaza (IA, EC. 3.2.1.68), mà thủy phân các liên kết α -1,6-glucosidic; pullulanaza (PA, EC. 3.2.1.41), mà thủy phân các liên kết α -1,6-glucosidic; 4- α -glucanotransferaza (4GT, EC. 2.4.1.25), mà xúc tác cho phản ứng transglycosyl hóa maltooligosacarit mạch ngắn, tạo ra maltooligosacarit mạch dài hơn; hoặc alpha-amylaza (EC 3.2.1.1), mà phân cắt liên kết α -1,4-glucosidic.

Hơn nữa, các dẫn xuất của 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 chứa α GP. Trong bước này, nếu sacarit bao gồm tinh bột, thì G1P được tạo thành từ tinh bột nhờ α GP; nếu sacarit chứa tinh bột hòa tan, amylopectin, hoặc maltodextrin, thì G1P được tạo ra từ tinh bột hòa tan, amylopectin, hoặc maltodextrin nhờ α GP.

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

sucroza, và các enzym chứa sucroza phosphorylaza, thì G1P được tạo ra từ sucroza nhờ sucroza phosphorylaza.

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

Theo một phương án khác, nếu sacarit chứa xenlodextrin và các enzym bao gồm xenlodextrin phosphorylaza, G1P được tạo ra từ xenlodextrin nhờ xenlodextrin phosphorylaza.

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

Theo sáng chế, alluloza cũng có thể được sản xuất từ fructoza. Một ví dụ về quy trình này được thể hiện trên 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 A6P được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thành alluloza được xúc tác bởi A6PP. Fructoza có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách chuyển hóa sucroza nhờ enzym.

Theo các phương án khác, alluloza có thể được điều chế từ sucroza. Một ví dụ về quy trình như vậy được thể hiện trên FIG.6. Quy trình này đề xuất con đường tổng hợp *in vitro* bao gồm các bước sử dụng enzym 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 A6P được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thành alluloza được xúc tác bởi A6PP.

Các ion phosphat được tạo ra khi A6P được chuyển hóa thành alluloza sau đó có thể được tái chế trong bước chuyển hóa sucroza thành G1P. Ngoài ra, như được thể hiện trên FIG.6, PPFK và polyphosphat có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất alluloza bằng cách tạo ra F6P từ fructoza tạo thành nhờ phân cắt bằng cách phân giải phospho sucroza bởi SP.

Theo một vài phương án, quy trình điều chế alluloza bao gồm các bước sau: tạo ra glucoza từ polysacarit và oligosacarit bằng cách thủy phân bằng enzym 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 polysacarit và oligosacarit được nêu trên đây.

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

Sáng chế đề xuất các quy trình chuyển hóa sacarit, như polysacarit và oligosacarit trong tinh bột, xenluloza, sucroza và các sản phẩm thu được của chúng, thành alluloza. Theo các phương án nhất định, các con đường tổng hợp bằng enzym không cần ATP nhân tạo (không tự nhiên) được đề xuất để chuyển hóa tinh bột, xenluloza, sucroza, và các sản phẩm thu được của chúng thành alluloza sử dụng các 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 chứa nhiều nhánh mà cản trở hoạt động của α GP. Isoamylaza có thể được sử dụng để bẻ nhánh tinh bột, tạo ra amyloextrin mạch thẳng. Tinh bột đã xử lý sơ bộ-isoamylaza có thể làm tăng nồng độ F6P trong sản phẩm cuối. Isoamylaza và pullulanaza phân cắt liên kết alpha-1,6-glycosidic, mà cho phép phân hủy tinh bột hoàn toàn hơn bởi alpha-glucan phosphorylaza. Alpha-amylaza phân cắt các liên kết alpha-1,4-glycosidic, nhờ đó alpha-amylaza được sử dụng để phân hủy tinh bột thành các đoạn để chuyển hóa thành alluloza nhanh hơn.

Như được thể hiện trên FIG.2, maltoza phosphorylaza (MP) có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất alluloza bằng cách phân cắt sản phẩm phân hủy maltoza thành G1P và glucoza nhờ phân giải phospho. Theo cách khác, 4-glucan transferaza (4GT) có thể được sử dụng để làm tăng hiệu suất alluloza bằng cách tái chế các sản phẩm phân hủy glucoza, maltoza, và maltotrioza thành maltooligosacarit mạch dài hơn; mà có thể được phân cắt nhờ phân giải phospho bằng α GP để tạo ra G1P.

Ngoài ra, xenluloza là nguồn sinh học dồi dào nhất và là thành phần chủ yếu của thành tế bào thực vật. Sinh khối lignoxenluloza không có nguồn gốc từ thực phẩm chứa xenluloza, hemixenluloza, và lignin cũng như là các thành phần phụ

khác. Xenluloza tinh khiết, bao gồm Avicel (xenluloza vi tinh thể), xenluloza tái sinh vô định hình, xenluloza vi khuẩn, giấy lọc, và v.v., có thể được tạo ra nhờ một loạt các quy trình xử lý. Các cơ chất xenluloza được thủy phân một phần bao gồm xenlodextrin không tan trong nước có mức polyme hóa lớn hơn 7, xenlodextrin tan trong nước có mức polyme hóa bằng 3-6, xenlobioza, glucoza, và fructoza.

Theo các phương án nhất định, xenluloza và sản phẩm dẫn xuất của nó có thể được chuyển hóa thành alluloza thông qua một loạt các bước. Ví dụ về quy trình như vậy được thể hiện trên FIG.3. Quy trình này đề xuất con đường tổng hợp *in vitro* mà 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 A6P được xúc tác bởi A6PE; và chuyển hóa A6P thành alluloza được xúc tác bởi A6PP. Trong quy trình này, các ion phosphat có thể được tái chế bằng bước chuyển hóa xenlodextrin và xenlobioza thành G1P.

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

Trước khi thủy phân xenluloza và tạo ra G1P, xenluloza và sinh khối có thể được xử lý sơ bộ để làm tăng độ phản ứng của chúng và làm giảm mức polyme hóa các chuỗi xenluloza. Các phương pháp xử lý sơ bộ xenluloza và sinh khối bao gồm xử lý sơ bộ bằng axit loãng, cắt phân đoạn lignoxenluloza dựa trên dung môi xenluloza, kéo dài sợi nhờ amoniac, ngâm trong dung dịch nước amoniac, xử lý bằng dung dịch ion, và thủy phân một phần bằng 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, do đó làm tăng hiệu suất của alluloza nhờ phosphoryl hóa sản phẩm thoái biến glucoza thành G6P, như được thể hiện trên FIG.3.

Theo các phương án khác, alluloza có thể được tạo ra từ glucoza. Ví dụ về quy trình như vậy được thể hiện trên FIG.5. Quy trình này 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 A6P được xúc tác bởi enzym; và chuyển hóa A6P thành alluloza được xúc tác bởi A6PP.

Dung dịch đệm sinh học thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực 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 dùng trong tất cả các phương án có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0. Tốt hơn nữa là, 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+} , Co^{2+} , và Zn^{2+} .

Nhiệt độ phản ứng mà tại đó tiến hành các bước của quy trình có thể nằm trong khoảng từ 37 đến 85°C. Tốt hơn nữa là, các bước này có thể được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C. Nhiệt độ này có thể là, ví dụ, khoảng 40°C, khoảng 45°C, khoảng 50°C, khoảng 55°C, hoặc khoảng 60°C. Tốt hơn nữa, 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 là, thời gian phản ứng là khoảng 24 giờ.

Các quy trình theo sáng chế có thể có hiệu suất cao do hằng số cân bằng cho toàn bộ phản ứng rất phù hợp. Xét về mặt lý thuyết, có thể đạt được hiệu suất tối đa là 99% 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 có chi phí thấp và làm giảm chi phí sản xuất nhờ làm giảm các chi phí có liên quan đến việc tách

nguyên liệu cấp và sản phẩm. Tinh bột, xenluloza, sucroza và một vài dẫn xuất của chúng là các nguyên liệu cấp ít tốn kém hơn, ví dụ, fructoza. Nếu alluloza được tạo ra từ fructoza, hiệu suất thu được thấp hơn so với sáng chế, và alluloza phải được tách ra từ fructoza nhờ sắc ký, điều này dẫn đến làm tăng chi phí sản xuất.

Ngoài ra, bước chuyển hóa A6P thành alluloza theo sáng chế là phản ứng phosphataza không thuận nghịch, bất kể nguyên liệu cấp. Do đó, alluloza được tạo ra có hiệu suất rất cao đồng thời làm giảm tối thiểu các chi phí tách sản phẩm sau đó.

Ngược với các phương pháp sản xuất dựa trên tế bào, sáng chế đề xuất quy trình điều chế alluloza không cần tế bào, có tốc độ phản ứng tương đối cao do loại bỏ màng tế bào, nhờ đó thường làm chậm sự vận chuyển cơ chất/sản phẩm vào và ra khỏi tế bào. Ngoài ra sản phẩm cuối cùng không chứa các chất chuyển hóa của tế bào/môi trường lên men giàu chất dinh dưỡng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Các hóa chất

Toàn bộ các hóa chất, kể cả tinh bột ngô, tinh bột hòa tan, maltodextrin, maltoza, glucoza, giấy lọc đều là loại chất phản ứng 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). Oligonucleotit được tổng hợp bởi Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) hoặc Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA). Trình tự nucleotit, SEQ ID NO 1, mã hóa cho A6PE ưa nhiệt từ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4). SEQ ID NO 2 là một phiên bản được tối ưu hóa codon của trình tự nucleotit đó. SEQ ID NO 3 là trình tự axit amin của enzym. Trình tự nucleotit SEQ ID NO 4 mã hóa A6PE ưa nhiệt từ *Bacillus thermoamylovorans* (UNIPROT ID A0A090IXZ8). SEQ ID NO 5 là phiên bản được tối ưu hóa codon của trình tự nucleotit đó. SEQ ID NO 6 là trình tự axit amin của enzym. Trình tự nucleotit SEQ ID NO 7 mã hóa cho A6PP ưa nhiệt từ

Clostridium thermocellum (UNIPROT ID A3DC21). SEQ ID NO 8 là phiên bản được tối ưu hóa codon của trình tự nucleotit. SEQ ID NO 9 là trình tự axit amin tương ứng với enzym. Xenluloza tái sinh vô định hình được sử dụng để tinh chế enzym được điều chế từ Avicel PH105 (FMC BioPolymer, Philadelphia, PA, USA) nhờ phân hủy và tái sinh, như được mô tả trong tài liệu: Ye et al., *Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of Clostridium thermocellum xenlodextrin phosphorylase 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 100mgL⁻¹ ampicilin hoặc 50mgL⁻¹ kanamycin được sử dụng để nuôi cấy tế bào *E. coli* và biểu hiện protein tái tổ hợp. Xenulaza 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) chứa plasmit biểu hiện protein được ủ trong bình Erlenmeyer có dung tích 1-L với 100mL môi trường ZYM-5052 chứa ampicilin 100mgL⁻¹ hoặc kanamycin 50mgL⁻¹. Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C bằng cách lắc quay ở tốc độ 220 vòng/phút trong 16-24 giờ. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 12°C và rửa một lần bằng HEPES 20mM (pH 7,5) chứa NaCl 50mM và MgCl₂ 5mM (kết tủa bằng nhiệt và mô đun gắn kết xenluloza) hoặc HEPES 20mM (pH 7,5) chứa NaCl 300mM và imidazol 5mM (tinh chế Ni). Tái huyền phù các kết viên tế bào trong cùng một dung dịch đệm và phân giải bằng cách siêu âm (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 500; gây 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 Profinity IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Các protein dung hợp chứa mô đun gắn kết

xenluloza (cellulose-binding module-CBM) và intein tự phân cắt được tinh chế bằng cách hấp thụ ái lực cao trên xenluloza tái sinh vô định hình 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 nhiệt. Độ tinh khiết của protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng cách điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE). A6PE được tinh chế bằng CoCl_2 80 μM có mặt trong môi trường nuôi cấy, dung dịch đệm giải hấp, dung dịch đệm thẩm tách, và dung dịch đệm bảo quản protein.

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

Alpha-glucan phosphorylase (αGP) 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 bằng cách 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 phosphoglucomutaza 25U/mL. Đơn vị (U) được biểu thị dưới dạng $\mu\text{mol/phút}$.

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 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 phosphoglucoisomeraza (PGI) khác nhau 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 MgCl_2 5mM và G6P 10mM ở nhiệt độ 50°C. 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 liên kết fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD), trong đó việc giảm hấp thụ ở bước sóng 340nm chứng tỏ F6P được tổng hợp. 200 μL hỗn hợp 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 0,1U, PK 5U, và LD 5U.

Alluloza 6-phosphat 3-epimeraza (A6PE) từ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4), SEQ ID NO 3, được sử dụng. Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa MgCl₂ 5mM, CoCl₂ 80 μ M, A6PP 1U/mL, và F6P 10mM ở nhiệt độ 50°C. Phản ứng được dừng bằng cách lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, alluloza 6-phosphat (A6P), được xác định bằng cách sử dụng alluloza 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 hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được trộn và sau đó được bổ sung 125 μ L axit ascorbic 5% (pH 5). Dung dịch sau khi trộn 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.

Alluloza 6-phosphat phosphataza (A6PP) từ *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DC21), SEQ ID NO 9, được sử dụng. Hoạt tính được đo trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa MgCl₂ 5mM, CoCl₂ 80 μ M, A6PE 1U/mL, và F6P 10mM ở 50°C. Phản ứng được dừng bằng cách lọc enzym bằng thiết bị cô Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Sản phẩm, alluloza, được xác định bằng cách phát hiện mức giải phóng phosphat tự do như được mô tả đối với A6PE.

Xenlodextrin phosphorylaza tái tổ hợp và xenlobioza phosphorylaza từ *C. thermocellum* được mô tả trong tài liệu Ye *et al.* Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails. ChemSusChem 2009; 2:149-152. 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 Liao *et al.*, One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphat glucokinaza from *Thermobifida fusca* YX: glucoza-6-phosphat generation without ATP. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012; 93:1109-1117. Hoạt tính của nó được thử nghiệm như được mô tả.

Isoamylaza tái tổ hợp từ *Sulfolobus tokodaii* được mô tả trong tài liệu Cheng et al., Doubling power output of starch biobattery treated by the most thermostable isoamylaza from an archaeon *Sulfolobus tokodaii*. Scientific Reports 2015; 5:13184. Hoạt tính của nó được thử nghiệm như được mô tả.

4-alpha-glucanotransferaza tái tổ hợp từ *Thermococcus litoralis* được mô tả trong tài liệu Jeon et al. 4- α -Glucanotransferaza from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus Litoralis*. Eur. J. Biochem. 1997; 248:171-178. Hoạt tính của nó được đo như được mô tả.

Sucroza phosphorylaza từ *Caldithrix abyssi* (UNIPROT H1XT50) được sử dụng. Hoạt tính của nó 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 phosphoglucomutaza 25U/mL như với 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 muốn tiến hành ví dụ 9 trong 8 giờ thay vì 24 giờ, các đơn vị của các enzym sẽ được tăng lên 3 lần. Ngược lại, nếu muốn tiến hành ví dụ 9 trong 48 giờ thay vì 24 giờ, các đơn vị enzym có thể được giảm 2 lần. Các ví dụ này minh họa cách sử dụng lượng đơn vị enzym để làm tăng hoặc làm giảm thời gian phản ứng đồng thời duy trì hiệu suất không đổi.

Ví dụ 1

Để xác định tính khả thi về mặt kỹ thuật của quá 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. maritima* (UNIPROT ID G4FEH8), phosphoglucomutaza từ *Thermococcus kodakaraensis* (UNIPROT ID Q68BJ6), và phosphoglucoisomeraza 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 tinh bột hòa tan 10g/L, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl₂ 5mM, ZnCl₂ 0,5mM, α GP 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 được liên kết fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD), trong đó việc giảm mức hấp thụ ở bước sóng 340nm chứng tỏ F6P được tổng hợp 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 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 tinh bột hòa tan 10g/L tạo ra F6P 0,9g/L ở nhiệt độ 40°C và F6P 3,6g/L ở nhiệt độ 80°C sau 40 giờ phản ứng. Các kết quả này gợi ý rằng việc làm tăng nhiệt độ phản ứng đối với nhóm các enzym này làm tăng hiệu suất F6P, tuy nhiên nhiệt độ quá cao có thể làm ảnh hưởng đến hoạt tính hoạt enzym.

Ví dụ 3

Nhận thấy rằng, ở nhiệt độ 80°C, tỷ lệ đơn vị enzym của α GP:PGM:PGI xấp xỉ bằng 1:1:1 dẫn đến tạo ra F6P nhanh. Được lưu ý là tỷ lệ enzym không làm ảnh hưởng nhiều đến nồng độ F6P cuối nếu thời gian phản ứng đủ dài. Tuy nhiên, tỷ lệ enzym làm ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng và tổng chi phí enzym được sử dụng trong hệ phản ứng này.

Ví dụ 4

0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 10g/L, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, $ZnCl_2$ 0,5mM, α GP 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 liên kết fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD) trong đó sự giảm mức hấp thụ ở bước sóng 340nm chứng tỏ F6P được tổng hợp như được mô tả trên đây. Nồng độ cuối của F6P sau 24 giờ là 3,6g/L.

Ví dụ 5

Để kiểm tra 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 giấy lọc/mL xenlulaza được trộn với Avicel 10g/L ở bể nước đá trong 10 phút. Sau khi ly tâm ở 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được chiết ra. Avicel mà liên 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 xenlodextrin phosphorylaza 5U/mL, xenlobioza phosphorylaza 5U/L, α GP 5U/mL, PGM 5U/mL, và PGI 5U/mL 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 và nồng độ F6P được nhận thấy là cao (lượng nhỏ glucoza và không có xenlobioza). F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym liên kết 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 tăng lượng hiệu suất F6P từ Avicel, Avicel được xử lý sơ bộ bằng axit phosphoric đậm đặc để tạo ra xenluloza vô định hình (RAC), như được mô tả trong tài liệu Zhang et al. *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 khỏi xenluloza mua trên thị trường, 10 đơn vị giấy lọc/mL xenlulaza được trộn với RAC 10g/L trong bể nước đá trong 5 phút. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được chiết ra. RAC được liên 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 xenlodextrin phosphorylaza 5U/mL, xenlobioza phosphorylaza 5U/L, α GP 5 U/mL, PGM 5U/mL, và PGI 5U/mL 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 với nồng độ cao được thu hồi vì enzym không được bổ sung để chuyển hóa glucoza thành F6P. F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym liên kết 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 khỏi xenluloza mua trên thị trường, 10 đơn vị giấy lọc/mL xenlulaza được trộn với RAC 10g/L trong bể nước đá trong 5 phút. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, dịch nổi chứa beta-glucosidaza được chất ra. RAC được liên 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 polyphosphat glucokinaza 5U/mL, xenlodextrin phosphorylaza 5U/mL, xenlobioza phosphorylaza 5U/mL, α GP 5U/mL, PGM 5U/mL, và PGI 5U/mL 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 là có nồng độ cao với chỉ một lượng nhỏ glucoza hiện có. F6P được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym liên kết 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 xác nhận sự tổng hợp alluloza từ F6P, F6P 2g/L được trộn với A6PE 1U/mL và A6PP 1U/ml trong dung dịch đệm HEPES 50mM (pH 7,2) chứa $MgCl_2$ 5mM và $CoCl_2$ 80 μ M. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 50°C. 99% F6P chuyển hóa thành alluloza được nhận thấy nhờ HPLC (Agilent 1100 series) bằng cách sử dụng cột Agilent Hi-Plex H và thiết bị phát hiện chỉ số khúc xạ. Mẫu được chạy trong H_2SO_4 5mM ở tốc độ 0,6mL/phút.

Ví dụ 9

Để xác nhận sự tổng hợp alluloza từ maltodextrin, 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 20g/L, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, $CoCl_2$ 80 μ M, 0,05U α GP, PGM 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Dừng phản ứng bằng cách lọc

enzym bằng thiết bị cột Vivaspin 2 (10.000 MWCO). Alluloza được phát hiện và định lượng bằng Agilent 1100 series HPLC với thiết bị 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. Các tiêu chuẩn của các nồng độ alluloza khác nhau được sử dụng để xác định hiệu suất.

Ví dụ 10

Hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 200g/L, dung dịch đệm axetat 10mM (pH 5,5), MgCl_2 5mM, CoCl_2 80 μM , và isoamylaza 0,1g/L được ủ ở nhiệt độ 80°C trong 24 giờ. Bước này được sử dụng để tạo ra hỗn hợp phản ứng khác chứa isoamylaza 20g/L đã xử lý maltodextrin, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl_2 5mM, αGP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U, và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 11

Hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 200g/L, dung dịch đệm axetat 10mM (pH 4,5), MgCl_2 5mM, và dung dịch pha loãng Novozym D6 pullulanaza theo tỷ lệ 1:200 được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 4 giờ. Bước này được sử dụng để tạo ra hỗn hợp phản ứng khác chứa pullulanaza 20g/L đã xử lý maltodextrin, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl_2 5mM, CoCl_2 80 μM , αGP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U, và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 12

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

0,2mL hỗn hợp phản ứng chứa isoamylaza 20g/L đã xử lý maltodextrin (xem ví dụ 9), dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, MgCl_2 5mM, CoCl_2 80 μM , αGP 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U, A6PP 0,05U, và 4GT 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 13

Để xác định khoảng nồng độ của dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS), 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 50g/L; 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; và PGI 0,1U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Khoảng thời gian ngắn để đảm bảo phản ứng chưa kết thúc, và do đó có thể nhận thấy rõ ràng sự chênh lệch về hiệu suất. Lượng F6P tạo ra được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym liên kết fructoza 6-phosphat kinaza (F6PK)/pyruvat dehydrogenaza (PK)/lactat dehydrogenaza (LD) trong đó việc giảm hấp thụ ở bước sóng 340nm chứng tỏ là F6P được tạo ra. Hiệu suất F6P 4,5g/L, 5,1g/L, 5,6g/L, 4,8g/L, hoặc 4,9g/L lần lượt thu được đối với 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 chứng tỏ là nồng độ PBS 25mM pH 7,2 là lý tưởng cho các điều kiện phản ứng cụ thể này. Quan trọng cần lưu ý rằng ngay cả khi sử dụng PBS 6,25mM ở pH 7,2 vẫn thu được hiệu suất đáng kể nhờ tái chế phosphat. Điều này chứng tỏ là phương pháp tái chế phosphat được mô tả là có thể giữ cho lượng phosphat thấp ngay cả ở mức năng suất dùng trong công nghiệp (ví dụ, 200-300g/L maltodextrin).

Bảng 1

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

Ví dụ 14

Để xác định khoảng pH của phản ứng theo đợt, 0,20mL hỗn hợp phản ứng chứa maltodextrin 50g/L; 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 0,02U; PGM 0,02U; và PGI 0,02U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 16 giờ. Các đơn vị được làm giảm để đảm bảo phản ứng chưa được kết thúc, và do đó mức chênh lệch về hiệu suất có thể được nhận thấy rõ rệt. Lượng F6P tạo ra được định lượng như trong ví dụ 12. Hiệu suất F6P 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 lần lượt thu

được đổi với 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 này, mặc dù hệ phản ứng này hoạt động trong một khoảng pH rộng.

Bảng 2

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

Ví dụ 15

Để nghiên cứu quy mô lớn, 20mL hỗn hợp phản ứng chứa isoamylaza 50g/L đã xử lý maltodextrin (xem ví dụ 10), dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5mM, $CoCl_2$ 80 μ M, α GP 10U, PGM 10U, PGI 10U, A6PE 10U, và A6PP 10U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 16

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

Ví dụ 17

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

Ví dụ 18

Để tạo ra alluloza từ fructoza, hỗn hợp phản ứng chứa fructoza 10g/L, dung dịch đệm Tris 50mM pH 7,0, polyphosphat 75mM, $MgCl_2$ 5mM, $CoCl_2$ 80 μ M,

fructoza polyphosphat kinaza 0,05U, A6PE 0,05U, và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 19

Để tạo ra alluloza từ glucoza, hỗn hợp phản ứng chứa glucoza 10g/L, dung dịch đệm 50mM Tris pH 7,0, polyphosphat 75mM, MgCl₂ 5mM, CoCl₂ 80μM, glucoza polyphosphat kinaza 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U, và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 20

Để tạo ra alluloza từ sucroza, hỗn hợp phản ứng chứa sucroza 10g/L, dung dịch nước muối được đệm phosphat 50mM pH 7,0, MgCl₂ 5mM, CoCl₂ 80μM, sucroza phosphorylaza 0,05U, PGM 0,05U, PGI 0,05U, A6PE 0,05U, và A6PP 0,05U được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

Ví dụ 21

Để làm tăng thêm hiệu suất của alluloza từ sucroza, polyphosphat 75mM và polyphosphat fructokinaza 0,05U được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong ví dụ 20. Lượng alluloza tạo ra được định lượng như trong ví dụ 9.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình điều chế alluloza, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 chuyển hóa fructoza 6-phosphat (F6P) thành alluloza 6-phosphat (A6P),
 được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat epimeraza; và
 chuyển hóa A6P thu được thành alluloza, được xúc tác bởi alluloza 6-phosphat phosphataza (A6PP).
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình còn bao gồm bước chuyển hóa glucoza 6-phosphat (G6P) thành F6P, trong đó bước này được xúc tác bởi phosphoglucoisomeraza (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 tinh bột hoặc dẫn xuất của nó, 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 tinh bột hoặc dẫn xuất của tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloza, amylopectin, tinh bột hòa tan, amylodextrin, maltodextrin, maltoza, và glucoza.
7. Quy trình theo 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; và tùy ý, bước chuyển hóa sucroza thành fructoza, 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, và tùy ý, bước chuyển hóa sucroza thành glucoza, trong đó bước này được xúc tác bởi ít nhất một enzym.

12. Quy trình theo điểm 1, trong đó A6PE bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 100% trình tự tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc 6.

13. Quy trình theo điểm 1, trong đó A6PP bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 100% trình tự tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

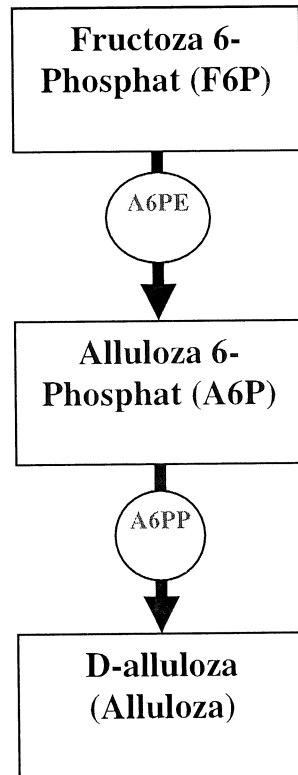
14. Quy trình theo điểm 1, trong đó A6PP là đặc hiệu với alluloza 6-phosphat.

15. Quy trình theo điểm 1, trong đó các bước của quy trình 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 8 đến 48 giờ.

16. Quy trình theo điểm 1, trong đó các bước của quy trình được tiến hành trong nhiều bình phản ứng sinh học được bố trí nối tiếp.

17. Quy trình theo điểm 1, trong đó các bước của quy trình được tiến hành không cần ATP, không cần NAD(H), ở nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 0mM đến 150mM, phosphat này được tái chế, và/hoặc ít nhất một bước của quy trình có liên quan đến phản ứng hóa học tiết kiệm năng lượng.

18. Quy trình theo điểm 1, trong đó các bước của quy trình được tiến hành trong một bình phản ứng sinh học.

**FIG. 1**

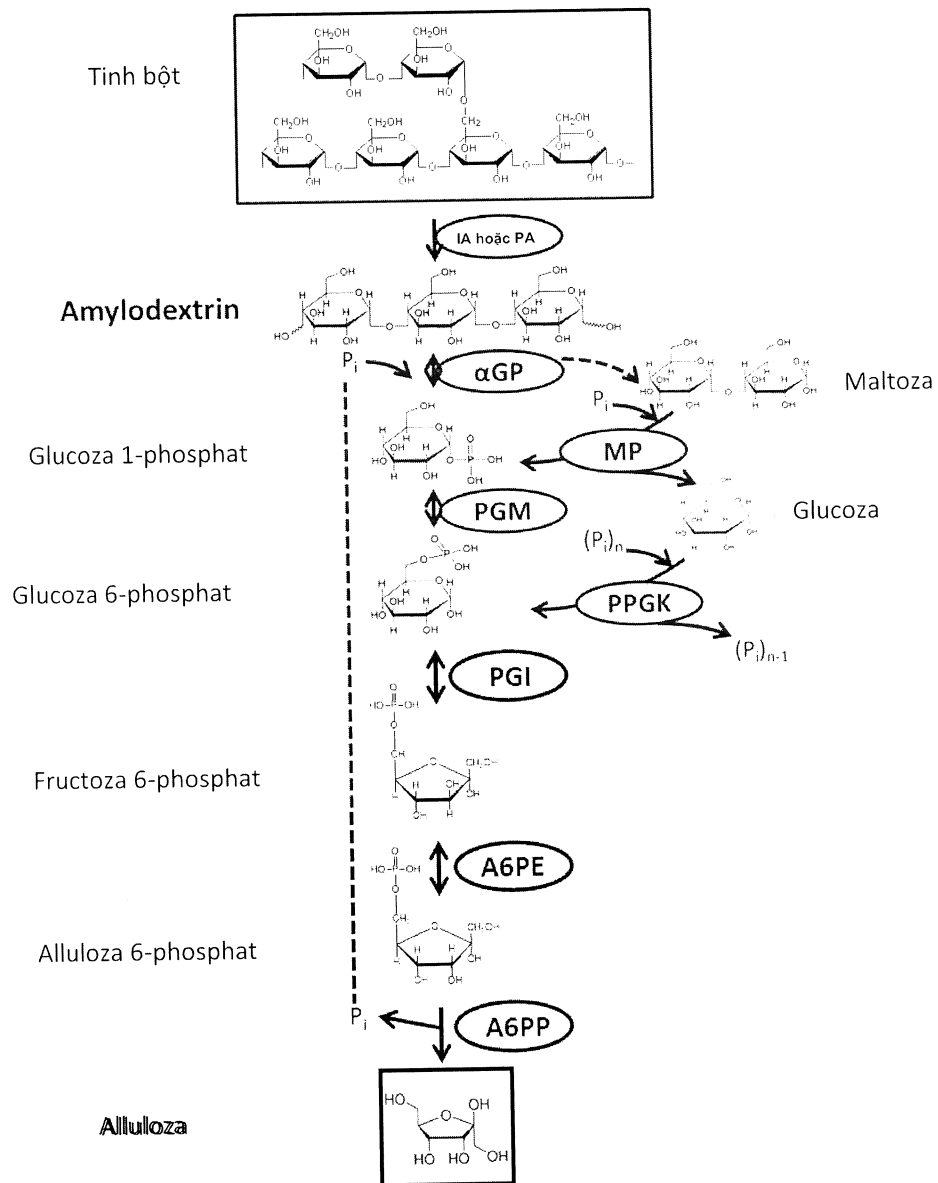


FIG. 2

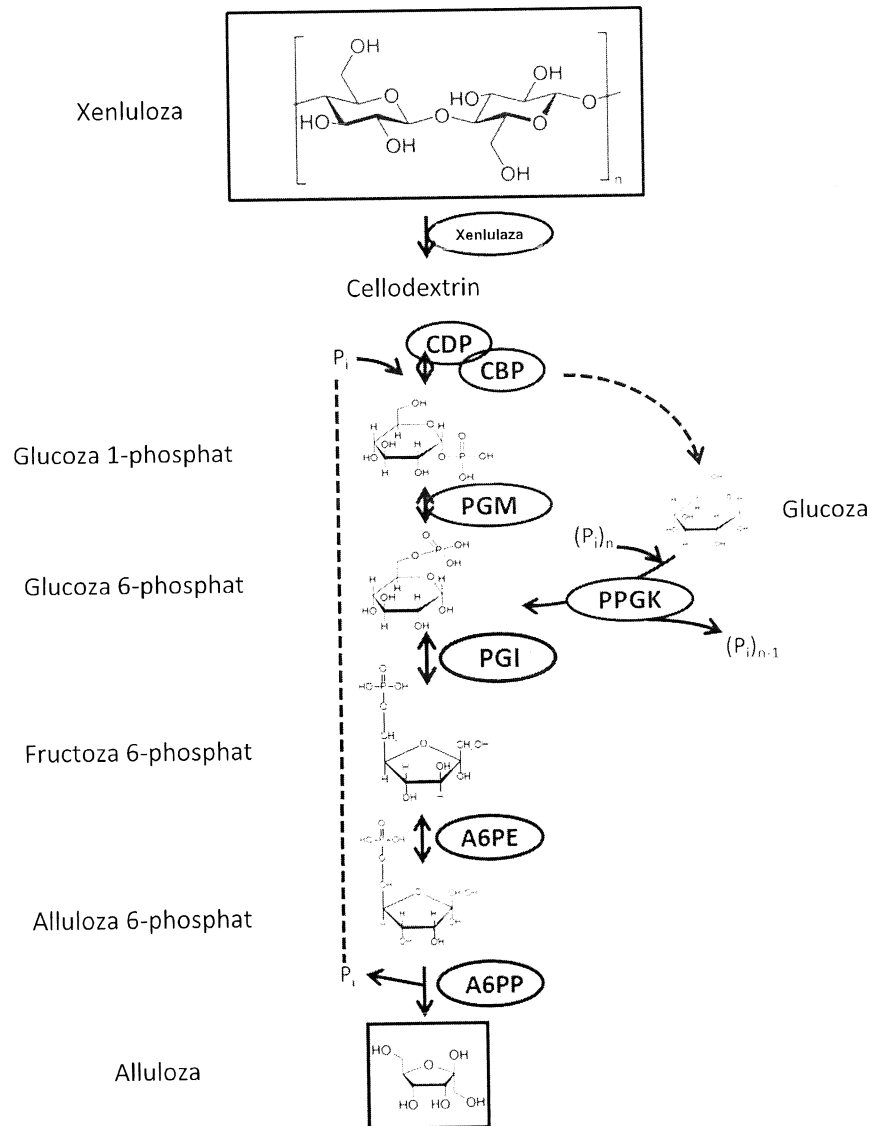


FIG. 3

4/7

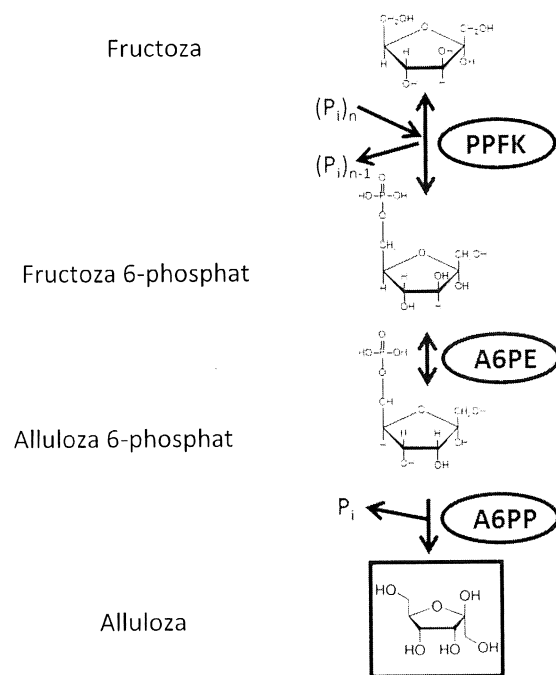


FIG. 4

5/7

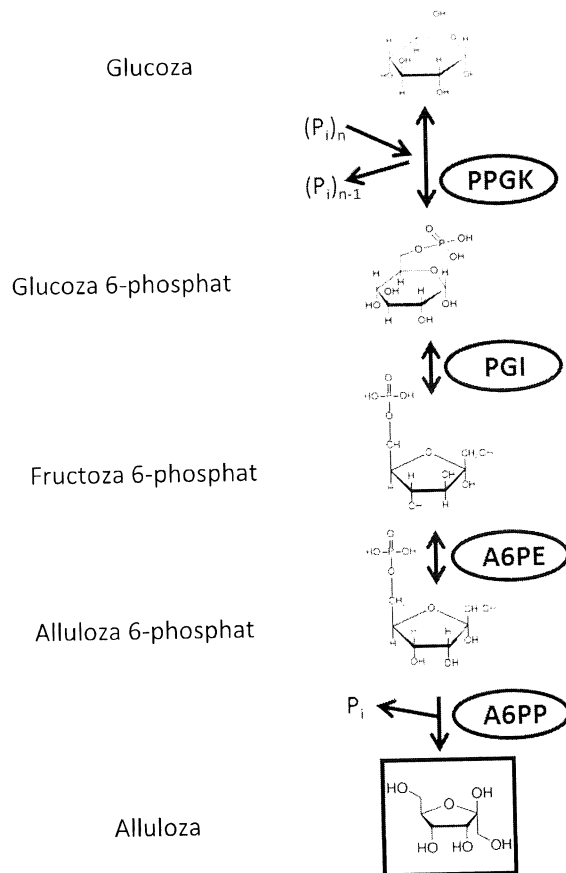


FIG. 5

6/7

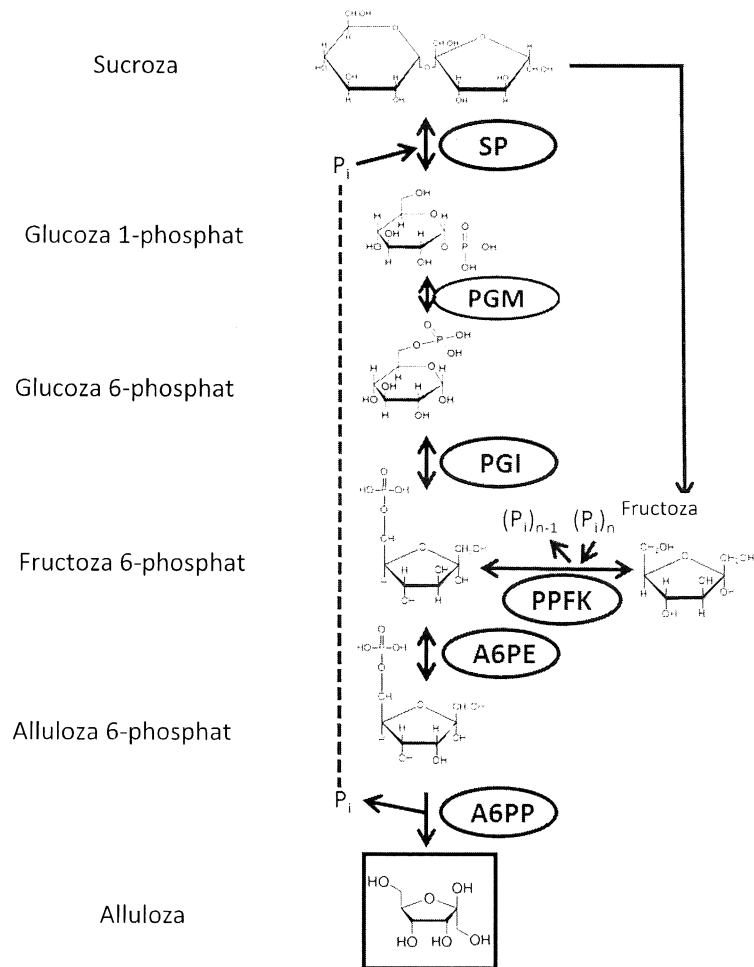


FIG. 6

7/7

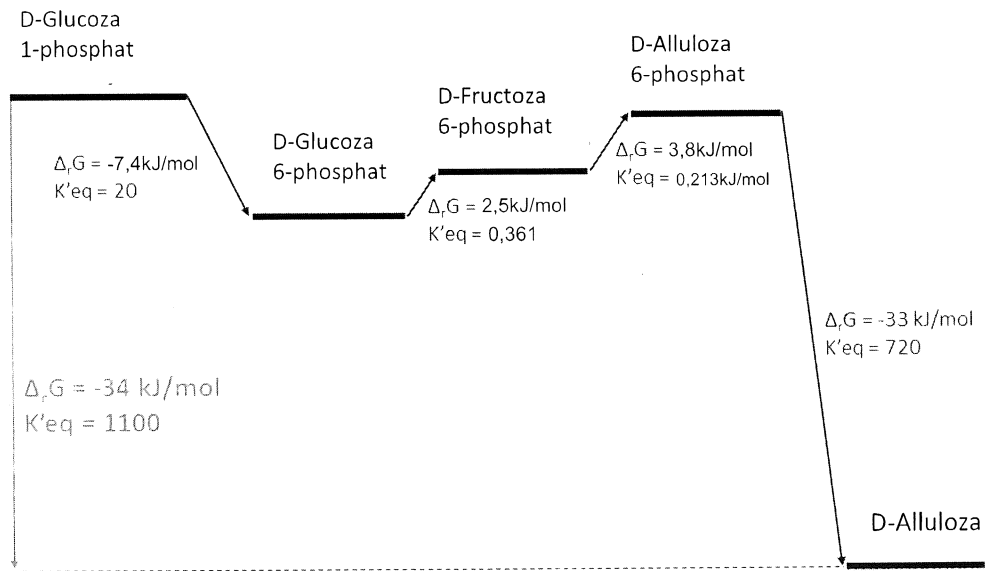


FIG. 7

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BONUMOSE LLC

<120> Quy trình điều chế alluloza

<130> 146.0003-WO00

<140> PCT/US17/66298

<141> 2017-12-14

<150> 62/434,033

<151> 2016-12-14

<160> 9

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 663

<212> ADN

<213> *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

<400> 1

atgaaatatt tatttttcgcc atctttaatg tgtatgaatt taatcaagct aaatgaacaa	60
atatctgttc ttaatagcaa ggcggtttt ttgcatgttg acatcatgga tggccatttt	120
gttaaaaata ttactttatc accgtttttt atagagcaga ttaaatacata tgtcaatatt	180
cctattgatg cacaccttat ggtagaaaat ccaggtgatt atattgaaat atgcgaaaaa	240
tcgggagcaa gttttataac tatacatgca gaaacaatta atagagaagc atttagaata	300
atagatagaa ttaaaagtca tggactcatg gttggcatag cattgaatcc agcaacacct	360
atctcggaat ttaaacatta tattaataaa atagataaga taacaataat gactgtcgat	420
cccggcttcg ctggtcaacc atttattccg gaggtattgg aaaagatccg agatctaaag	480
agactgaaag atgataataa ttataattat ttaattgaag cagatggttc ctgcaataaa	540
aatacgtttc aagtgcataa agatgccgga tgtaaagttt tcgtattagg ttcacaggg	600
ctttttaatc ttagcgatga tttgggaaaa gcgtgggaaa taatgattgg caattttaat	660
gga	663

<210> 2

<211> 663

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> A6PE *thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* được tối ưu hóa codon

<400> 2

atgaagtacc tgttttagccc gagcctgatg tgcatgaatc tgattaagct gaatgaacag	60
attagcggtc tgaatagcaa agccgatttt ctgcatgttg atattatgga tgggtcatttt	120
gttaagaaca tcaccctgag cccgtttttt attgaacaga ttaagagcta tgtgaatatc	180

```

ccgattgatg cccatctgat ggtggaaaat ccgggtgact atattgaaat ttgtgaaaaa      240
agcggcgcaa gttttattac cattcatgcc gaaaccatta atcgtgaagc atttcgtatt      300
attgaccgta ttaagagtca tggctctgatg gtgggcattg cactgaatcc ggccaccccg      360
attagcgaaa ttaagcatta tattaacaag atcgacaaga tcaccattat gaccgttgat      420
ccgggctttg caggccagcc gtttattccg gaagtgctgg aaaaaattcg cgatctgaaa      480
cgtctgaaag atgataataa ttacaactac ctgatcgaag ccgatggtag ttgcaataag      540
aatacctttc aggttctgaa agatgcaggc tgcaaagttt ttgtgctggg cagtagcggg      600
ctgtttaatc tgagtgatga tctgggcaaa gcatgggaaa ttatgattgg caattttaat      660
ggc                                                                    663

```

```

<210> 3
<211> 221
<212> PRT
<213> Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum

```

```

<400> 3

```

```

Met Lys Tyr Leu Phe Ser Pro Ser Leu Met Cys Met Asn Leu Ile Lys
1              5              10              15

```

```

Leu Asn Glu Gln Ile Ser Val Leu Asn Ser Lys Ala Asp Phe Leu His
                20              25              30

```

```

Val Asp Ile Met Asp Gly His Phe Val Lys Asn Ile Thr Leu Ser Pro
35              40              45

```

```

Phe Phe Ile Glu Gln Ile Lys Ser Tyr Val Asn Ile Pro Ile Asp Ala
50              55              60

```

```

His Leu Met Val Glu Asn Pro Gly Asp Tyr Ile Glu Ile Cys Glu Lys
65              70              75              80

```

```

Ser Gly Ala Ser Phe Ile Thr Ile His Ala Glu Thr Ile Asn Arg Glu
85              90              95

```

```

Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Lys Ser His Gly Leu Met Val Gly
100              105              110

```

```

Ile Ala Leu Asn Pro Ala Thr Pro Ile Ser Glu Ile Lys His Tyr Ile
115              120              125

```

```

Asn Lys Ile Asp Lys Ile Thr Ile Met Thr Val Asp Pro Gly Phe Ala
130              135              140

```

```

Gly Gln Pro Phe Ile Pro Glu Val Leu Glu Lys Ile Arg Asp Leu Lys

```

145					150					155					160
Arg	Leu	Lys	Asp	Asp	Asn	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly
				165					170					175	
Ser	Cys	Asn	Lys	Asn	Thr	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Gly	Cys	Lys
			180					185					190		
Val	Phe	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asn	Leu	Ser	Asp	Asp	Leu
		195					200					205			
Gly	Lys	Ala	Trp	Glu	Ile	Met	Ile	Gly	Asn	Phe	Asn	Gly			
	210					215					220				

```
<210> 4
<211> 690
<212> ADN
<213> Bacillus thermoamylovorans
```

<400>	4						
atgagcaaca	aaattgaatt	ttcacgtct	ttaatgacaa	tggatttaga	caagttaa		60
gaacagatta	ctttttaa	taatcatgtc	ggttcctacc	atatcgatat	tatggacgga		120
cattatgtac	ctaataaac	tctatcccct	tggtttgtcc	aagaggtag	gaaaattagt		180
gatgttccga	tgtctgccca	cttgatgggc	acaaaccaa	gtttttgggt	acaacaactc		240
attgatatta	agtgtgaatg	gatttgcatt	cacgtagaaa	cccttgatgg	gttagctttc		300
cgcttaattg	atcaaatacca	cgatgcggga	ttaaagcag	gggtcgtatt	aatcctgaa		360
acaagtgttg	atgcgattcg	cccgtagatt	gatttagtgg	ataaagtcac	cattatgact		420
gtcgacctag	gttttgcagg	tcaacgcttt	attgatagta	cattggagaa	aatcgtggaa		480
ttaaaaaaat	tacgggaaga	acacgggttat	aatatgtga	ttgaaatgga	tggatcttcg		540
aatcggaaat	ccttcaagaa	aatttatgaa	gccggctctg	acatttatat	tataggtcgc		600
agcggtttgt	ttggattaca	cgaagatatc	gaaaaagcat	gggaaatcat	gtgcaaagat		660
tttgaggaaa	tgactggcga	aaaagtatta					690

<210>	5
<211>	690
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> A6PE ưa nhiệt từ *Bacillus thermoamylovorans* được tối ưu hóa codon

```
<400> 5
atgagtaaca agatcgaatt cagcccgagc ctgatgacca tggatctgga taaatttaaa 60
gaacagatca cctttctgaa caatcatggt ggcagttatc atattgatat catggatggt 120
cattacgtgc cgaatattac cctgagcccc tggtttgttc aggaagtgcg caaaattagc 180
```



```

gatgttccga tgagcgcaca tctgatggtt accaatccga gtttttgggt tcagcagctg      240
attgatatta aatgtgaatg gatttgcatg catgttgaaa ccctggatgg cctggccttt      300
cgtctgattg atcagattca tgatgccggc ctgaaagcag gtgtgggttct gaatccggaa      360
accagtgtgg atgccattcg tccgtatatt gatctgggtg ataaagttac catcatgacc      420
gtggatccgg gctttgccgg ccagcgcttt attgatagca ccctggaaaa aattgtggaa      480
ctgcgtaaac tgcgtgaaga acatggttat aaatatgtga ttgagatgga tggcagcagc      540
aatcgcaaaa gctttaaaaa aatttacgag gcaggtccgg atatttatat tattggccgt      600
agtggcctgt ttggcctgca tgaagatatt gaaaaagcat gggaaattat gtgtaaggat      660
tttgaagaaa tgaccggtga aaaagtgctg      690

```

```

<210> 6
<211> 230
<212> PRT
<213> Bacillus thermoamylovorans

```

```

<400> 6

```

```

Met Ser Asn Lys Ile Glu Phe Ser Pro Ser Leu Met Thr Met Asp Leu
1          5          10          15

```

```

Asp Lys Phe Lys Glu Gln Ile Thr Phe Leu Asn Asn His Val Gly Ser
          20          25          30

```

```

Tyr His Ile Asp Ile Met Asp Gly His Tyr Val Pro Asn Ile Thr Leu
          35          40          45

```

```

Ser Pro Trp Phe Val Gln Glu Val Arg Lys Ile Ser Asp Val Pro Met
          50          55          60

```

```

Ser Ala His Leu Met Val Thr Asn Pro Ser Phe Trp Val Gln Gln Leu
65          70          75          80

```

```

Ile Asp Ile Lys Cys Glu Trp Ile Cys Met His Val Glu Thr Leu Asp
          85          90          95

```

```

Gly Leu Ala Phe Arg Leu Ile Asp Gln Ile His Asp Ala Gly Leu Lys
          100          105          110

```

```

Ala Gly Val Val Leu Asn Pro Glu Thr Ser Val Asp Ala Ile Arg Pro
          115          120          125

```

```

Tyr Ile Asp Leu Val Asp Lys Val Thr Ile Met Thr Val Asp Pro Gly
          130          135          140

```

```

Phe Ala Gly Gln Arg Phe Ile Asp Ser Thr Leu Glu Lys Ile Val Glu

```

[illegible]

```
<210> 7
<211> 651
<212> ADN
<213> Clostridium thermocellum
```

<400> 7							
atgattaaat	acaaagcggg	attctttgat	tttgactata	cgctggcaga	ttcatctaaa		60
gctgttatag	aatgtattaa	ctatgcactg	caaaaaatgg	gttatcccga	atcttctccg		120
gaaagtat	gcagaacaat	aggacttacg	ttggccgagg	cttttaaaat	acttagcggg		180
gatacttctg	attccaatgc	ggaccttttc	cgccaatact	ttaaagaaaag	agcagatctg		240
gttatgtgtg	accggactgt	aatgtacagc	actgttgaat	gtgttttgaa	gaagctgaaa		300
aaggcggatg	taaaaacagg	aattgtttca	acgaagtaca	gatacaggat	agaggatata		360
ttaaaaaggg	acaaactttt	acagtat	gatgtaattg	tcggcgggga	agatgttgcg		420
gcccataaac	cggatccgga	agggcttcta	aaggccatat	cgatggttgg	ctgccaaaag		480
gaagaagtcc	tttttgtcgg	agacagtacg	gtggatgcaa	ggactgcaaa	aaatgcggga		540
gtggat	ttttg	tggttct	tacggggaca	accggggcaa	atgagttttc	agagtataat	600
cctgggtgctg	tgattgaaga	tttgagtgg	ttattggata	tgtttatgtt	a		651

<210>	8
<211>	651
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> A6PP được tối ưu hóa codon từ *Clostridium thermocellum*

```
<400>      8
atgatcaagt acaaggccgt tttttttgat tttgattaca ccctggcaga tagcagcaaa      60
gccgttattg aatgtattaa ttacgccttg cagaaaatgg gctatccgga aagcagtcgg      120
```

```

gaaagcattt gtcgtaccat tggcctgacc ctggcagaag catttaaaat tctgagcggg 180
gataccagcg atagcaatgc cgatctgttt cgccagtatt ttaaagaacg cgcagatctg 240
gttatgtgtg atcgcacctg gatgtatagc accgtggaat gcgtgctgaa aaaactgaaa 300
aaagcagatg ttaagaccgg tattgtgagc accaaatatc gctatcgtat tgaagatatt 360
ctgaaacgtg ataaactgct gcagtatttt gatgttattg ttggtggcga agatgttgcc 420
gcccataaac cggatccgga aggctgctg aaagcaatta gcatggtggg ctgccagaaa 480
gaagaagttc tgtttgttgg tgatagcacc gttgatgcac gtaccgcaa aaatgcaggc 540
gtggattttg tggccgttct gaccggcacc accggcgcaa atgaatttag cgaatataat 600
ccgggcgccg tgattgaaga tctgagcggg ctgctggata tgtttatgct g 651

```

```

<210> 9
<211> 217
<212> PRT
<213> Clostridium thermocellum

```

```
<400> 9
```

```

Met Ile Lys Tyr Lys Ala Val Phe Phe Asp Phe Asp Tyr Thr Leu Ala
1           5           10           15

```

```

Asp Ser Ser Lys Ala Val Ile Glu Cys Ile Asn Tyr Ala Leu Gln Lys
          20           25           30

```

```

Met Gly Tyr Pro Glu Ser Ser Pro Glu Ser Ile Cys Arg Thr Ile Gly
          35           40           45

```

```

Leu Thr Leu Ala Glu Ala Phe Lys Ile Leu Ser Gly Asp Thr Ser Asp
          50           55           60

```

```

Ser Asn Ala Asp Leu Phe Arg Gln Tyr Phe Lys Glu Arg Ala Asp Leu
65           70           75           80

```

```

Val Met Cys Asp Arg Thr Val Met Tyr Ser Thr Val Glu Cys Val Leu
          85           90           95

```

```

Lys Lys Leu Lys Lys Ala Asp Val Lys Thr Gly Ile Val Ser Thr Lys
          100          105          110

```

```

Tyr Arg Tyr Arg Ile Glu Asp Ile Leu Lys Arg Asp Lys Leu Leu Gln
          115          120          125

```

```

Tyr Phe Asp Val Ile Val Gly Gly Glu Asp Val Ala Ala His Lys Pro
          130          135          140

```

```

Asp Pro Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ile Ser Met Val Gly Cys Gln Lys

```

39000

145					150					155					160
Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Val	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Asp	Ala	Arg	Thr	Ala
				165					170					175	
Lys	Asn	Ala	Gly	Val	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly
			180					185					190		
Ala	Asn	Glu	Phe	Ser	Glu	Tyr	Asn	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Glu	Asp	Leu
		195					200					205			
Ser	Gly	Leu	Leu	Asp	Met	Phe	Met	Leu							
210						215									