



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126392** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 9/90 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/24 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

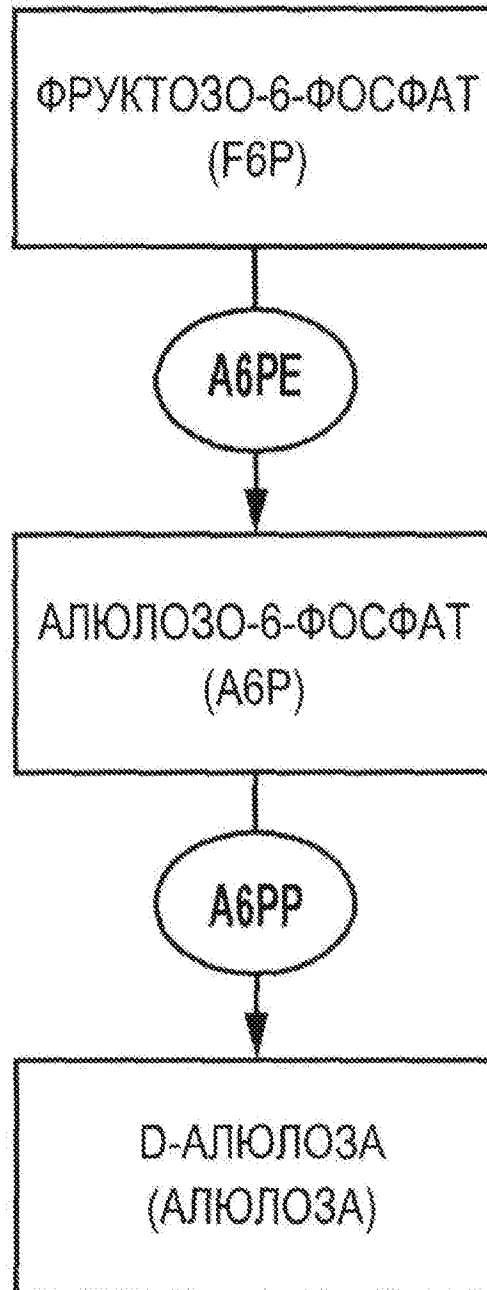
(21) Номер заявки:	а 2019 07979	(73) Володілець (володільці): БОНАМОУЗ ІНК, 1725 Discovery Drive, Suite 220, Charlottesville, VA 22911, United States of America (US)
(22) Дата подання заявки:	14.12.2017	(74) Представник: Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.09.2022	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2014/049373 A1, 03.04.2014 WO 2011/040708 A2, 07.04.2011 US 2015/0284759 A1, 08.10.2016 WO 2015/032761 A1, 12.03.2015 EP 2990483 A1, 02.03.2016 EP 3480306 A2, 08.05.2019 WO 2018/12975 A1, 12.07.2018 KR 2011041910 A, 22.04.2011 CHAN ET AL.: "Structural Basis for Substrate Specificity in Phosphate Binding ([beta]/[alpha])8-Barrels: d-Allulose 6- Phosphate 3-Epimerase from Escherichia coli K-12", BIOCHEMISTRY, 01.01.2008/. - Vol. 47. - pages 9608 - 9617 ZHIBING LU ET AL.: "HAD Superfamily Phosphotransferase Substrate Diversification: Structure and Function Analysis of HAD Subclass IIB Sugar Phosphatase BT4131", BIOCHEMISTRY, 01.06.2005. - vol. 44. - no. 24. - pages 8684 - 8696 "HPr(Ser) phosphatase (GeneBT_4315). Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI- 5482)", UniProt, 01.06.2003 Karen N Allen ET AL.: "Evolution of New Specificities in a Superfamily of Phosphatases", Beilstein-Institut. Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations, September 2009. - pages 67 - 77 NIR LONDON ET AL.: "Covalent Docking Predicts Substrates for Haloalkanoate Dehalogenase Superfamily Phosphatases", BIOCHEMISTRY, 05.01.2015. - vol. 54. - no. 2. - pages 528 - 537
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/434,033	
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14.12.2016	
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US	
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.09.2019, Бюл.№ 17	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.09.2022, Бюл.№ 39	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2017/066298, 14.12.2017	
(72)	Винахідник(и): Віхелецький Деніел Джозеф (US), Роджерс Едвін О. (US)	

UA 126392 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АЛЮЛОЗИ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання алюлози, який включає перетворення фруктозо-6-фосфату (F6P) на алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфат-3-епімерази (A6PE); і перетворення одержуваного A6P на алюлозу, каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфат-фосфатази (A6PP).



ФІГ. 1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА ПОВ'ЯЗАНІ ЗАЯВКИ

[1] За даною заявкою запитують пріоритет заявки США із серійним № 62/434,033, поданої 14 грудня 2016 року, яка включена в даний опис за допомогою посилання.

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

5 [2] Винахід належить до одержання цукру D-алюлози. Більш конкретно, винахід належить до способів одержання D-алюлози за допомогою ферментативного перетворення сахаридів (наприклад, полісахаридів, олігосахаридів, дисахаридів, сахарози, D-глюкози і D-фруктози) в D-алюлозу.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

10 [3] D-алюлоза (також відома як D-психоза) (далі алюлоза) являє собою низькокалорійний, природний підсолоджувач, який має 70 % солодкості сахарози, але тільки 10 % калорій. Вона представляє моносахарид гексозу, що зустрічається в природі, присутній тільки в малих кількостях у пшениці і інших рослинах. Аллюлоза схвалена як харчова добавка в Food and Drug Administration (FDA) в 2012 році, яка віднесена до загальноновизнаних як безпечна (GRAS). Однак, через високі продажні ціни алюлози, її використання як підсолоджувача обмежене. Аллюлоза
15 відома множиною аспектів користі для здоров'я: вона низькокалорійна (10 % від сахарози); вона має дуже низький глікемічний індекс 1; вона повністю абсорбується в тонкій кишці, але не метаболізується, і замість цього секретується в сечу і фекалії; вона допомагає регулювати цукор крові за допомогою інгібування α -амілази, сукрази і мальтази; і в продуктах харчування і
20 напоях вона має функціональність, схожу із сахарозою. По суті, алюлоза явно має різні застосування в індустрії продуктів харчування і напоїв.

[4] У даний час алюлозу одержують в основному через ферментативну ізомеризацію фруктози (WO 2014049373). Загалом, спосіб відрізняється підвищеними витратами на вихідну сировину, дорогим відділенням алюлози від фруктози і відносно низьким виходом продукту.

25 [5] Існує необхідність розробити економічно ефективний шлях синтезу для одержання алюлози з високим виходом, де щонайменше одна стадія способу включає енергетично сприятливу хімічну реакцію. Крім того, існує потреба в способі одержання, у якому стадії способу можна проводити в одному резервуарі або біореакторі. Також існує потреба в способі одержання алюлози, який можна проводити при відносно низькій концентрації фосфату, де
30 фосфат можна використовувати повторно, і/або в способі, який не вимагає використання аденозинтрифосфату (АТФ) як джерела фосфату. Також існує потреба в шляху одержання алюлози, для якого не потрібно використовувати дорогий кофермент нікотинамідаденозиндинуклеотид (NAD(H)) на будь-якій зі стадій реакції.

СУТЬ ВИНАХОДУ

35 [6] Винаходи, описані в даному описі, належать до способу одержання алюлози. У різних аспектах способи включають перетворення фруктозо-6-фосфату (F6P) в алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфат-3-епімерази (A6PE); і перетворення A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфатфосфатази (A6PP). Винаходи також належать до алюлози, одержуваної за допомогою будь-якого зі способів, описаних у даному
40 описі.

[7] У деяких аспектах винаходу, спосіб одержання алюлози також включає стадію перетворення глюкозо-6-фосфату (G6P) в F6P, де стадію каталізують за допомогою фосфоглюкоізомерази (PGI). В інших аспектах способу синтез алюлози також включає стадію перетворення глюкозо-1-фосфату (G1P) в G6P, і цю стадію перетворення каталізують за
45 допомогою фосфоглюкомутази (PGM).

[8] У різних аспектах спосіб одержання алюлози може включати перетворення сахариду в G1P, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту; перетворення G1P в G6P, каталізоване за допомогою фосфоглюкомутази (PGM); перетворення G6P в F6P, каталізоване за допомогою фосфоглюкоізомерази (PGI); перетворення F6P в алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення одержуваного A6P в алюлозу, каталізоване за
50 допомогою A6PP.

[9] Сахариди, використовувані в будь-якому зі способів, можна вибирати із групи, що складається із крохмалю або його похідного, целюлози або її похідного і сахарози. Крохмаль або його похідне може являти собою амілозу, амілопектин, розчинний крохмаль, амілодекстрин, мальтодекстрин, мальтозу або глюкозу. У деяких аспектах винаходу спосіб одержання алюлози
55 включає перетворення крохмалю в похідне крохмалю за допомогою ферментативного гідролізу або за допомогою кислотного гідролізу крохмалю. В інших аспектах, похідне крохмалю можна одержувати за допомогою ферментативного гідролізу крохмалю, каталізованого за допомогою ізоамілази, пулуланази, α -амілази або комбінації із двох або більше із цих ферментів. Спосіб
60 одержання алюлози, у визначених аспектах, також може включати додавання 4-

глюкантрансферази (4GT).

[10] У різних аспектах спосіб одержання алюлози може включати перетворення фруктози в F6P, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту; перетворення F6P в алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення одержуваного A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою A6PP. В інших варіантах здійснення спосіб одержання алюлози включає перетворення сахарози у фруктозу, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту; перетворення фруктози в F6P, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту; перетворення F6P в алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення одержуваного A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою A6PP.

[11] В інших аспектах винаходу, G6P, що підлягає використанню в способі одержання алюлози, можна утворювати за допомогою перетворення глюкози в G6P, каталізованого за допомогою щонайменше одного ферменту. Глюкозу можна, у свою чергу, одержувати за допомогою перетворення сахарози в глюкозу, каталізованого за допомогою щонайменше одного ферменту.

[12] В інших аспектах винаходу, стадії способу одержання алюлози проводять без АТФ, без NAD(H), при концентрації фосфату приблизно від 0 мМ приблизно до 150 мМ, фосфат використовують повторно і/або щонайменше одна стадія способу включає енергетично сприятливу хімічну реакцію.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[13] Ці креслення ілюструють визначені аспекти деяких з варіантів здійснення винаходу, і їх не слід використовувати як обмеження або визначення винаходу.

[14] На фіг. 1 представлено схематичне зображення, що ілюструє ферментативний шлях перетворення фруктозо-6-фосфату в алюлозо-6-фосфат і потім в алюлозу.

[15] На фіг. 2 представлено схематичне зображення, що ілюструє ферментативний шлях перетворення крохмалю або його похідних продуктів в алюлозу. Використовують наступні скорочення: αGP, α-глюканфосфорилаза або крохмальфосфорилаза; PGM, фосфоглюкомутаза; PGI, фосфоглюкоізомераза; IA, ізоамілаза; PA, пулуланаза; MP, мальтозофосфорилаза; PPGK, поліфосфатглюкокіназа.

[16] На фіг. 3 представлений ферментативний шлях перетворення целюлози або її похідних продуктів в алюлозу. CDP, целодекстринфосфорилаза; CBP, целобіозофосфорилаза; PPGK, поліфосфатглюкокіназа; PGM, фосфоглюкомутаза; PGI, фосфоглюкоізомераза.

[17] На фіг. 4 представлено схематичне зображення, що ілюструє ферментативний шлях перетворення фруктози в алюлозу. PPFK, поліфосфатфруктокіназа.

[18] На фіг. 5 представлено схематичне зображення, що ілюструє ферментативний шлях перетворення глюкози в алюлозу. PPGK, поліфосфатглюкокіназа; PGI, фосфоглюкоізомераза.

[19] На фіг. 6 представлений ферментативний шлях перетворення сахарози або її похідних продуктів в алюлозу. SP, сахарозфосфорилаза; PPFK, поліфосфатфруктокіназа; PGM, фосфоглюкомутаза; PGI, фосфоглюкоізомераза.

[20] На фіг. 7 представлена енергія Гіббса для реакції між проміжними продуктами на основі енергії Гіббса для утворення при перетворенні глюкозо-1-фосфату в алюлозу.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[21] Винахід належить до ферментативних шляхів або способів для синтезу алюлози з високим виходом продукту при значному зниженні витрат на виділення продукту і вартості одержання алюлози.

[22] Винахід належить до способу одержання алюлози, де спосіб включає перетворення фруктозо-6-фосфату (F6P) в алюлозо-6-фосфат (A6P), каталізоване за допомогою епімерази, і перетворення одержуваного A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою фосфатази (наприклад, алюлозо-6-фосфатфосфатази, A6PP). Цей спосіб у цілому показаний на фіг. 1. У визначених варіантах здійснення епімераза, яка каталізує перетворення F6P в A6P, являє собою алюлозо-6-фосфат-3-епімеразу (A6PE).

[23] Епімерази, які перетворюють F6P в A6P, можна використовувати в способі за винаходом. Епімерази також здатні перетворювати A6P в F6P. У деяких аспектах винаходу епімерази, придатні для використання в способах для того, щоб перетворювати F6P в A6P, містять амінокислотну послідовність, яка має ступінь ідентичності з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 3 або 6 щонайменше 45 %, більш переважно щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 55 %, більш переважно щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 %, більш переважно щонайменше 75 %, більш переважно щонайменше 80 %, більш переважно щонайменше 85 %, найбільш переважно щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 або щонайменше 94 %, найбільш переважно щонайменше 95 % і навіть найбільш переважно щонайменше 96, 97,

98, 99 або 100 %. Придатні епімерази кодує полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка має ступінь ідентичності з нуклеотидною послідовністю з SEQ ID NO: 1, 2, 4 і 5 щонайменше 30 %, переважно щонайменше 35 %, більш переважно щонайменше 40 %, більш переважно щонайменше 45 %, більш переважно щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 55 %, більш переважно щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 %, більш переважно щонайменше 75 %, більш переважно щонайменше 80 %, більш переважно щонайменше 85 %, найбільш переважно щонайменше 90 %, найбільш переважно щонайменше 95 % і ще більш переважно щонайменше 96, 97, 98, 99 або 100 %.

[24] Приклади A6PE включають, але не обмежуючись цим, наступні білки, ідентифіковані номерами UNIPROT ID: D9TQJ4, A0A090IXZ8 і P32719. Серед них, D9TQJ4 і A0A090IXZ8 одержують із термофільних організмів. P32719 одержують із мезофільного організму. P32719 на 53 % ідентичний A0A090IXZ8 і на 55 % ідентичний D9TQJ4, і кожний білок каталізує епімеризацію F6P в A6P. Крім того, A0A090IXZ8 на 45 % ідентичний D9TQJ4. Навпаки, інші епімеразні білки, ідентифіковані за номерами UNIPROT ID: A0A101D823, R1AXD6, A0A150LBU8, A0A023CQG9 і H1XWY2, які мають визначений ступінь ідентичності з D9TQJ4 в 45 % або менше, не каталізують епімеризацію F6P в A6P.

[25] У деяких аспектах винаходу епімерази, придатні для використання в способах для того, щоб перетворювати F6P в A6P, використовують кофактор двовалентний метал: переважно, але не обмежуючись цим, кобальт. У додаткових аспектах за винаходом епімераза містить, але не обмежуючись цим, домен (α/β)₈-бочонка для каталізу; додатково, але не обмежуючись цим, містить фосфатзв'язуючий домен, що містить Ser на кінці 7-го β -тяжа бочонка, Ser на кінці 8-го β -тяжа бочонка і Gly у петлі активного центра; додатково, але не обмежуючись цим, містить металзв'язуючий домен, що містить His в 2-му і 3-му β -тяжах бочонка; додатково, але не обмежуючись цим, містить Asp в 2-му і 7-му β -тяжі бочонка, щоб діяти як кислотний/основний каталізатор для переносу 1,1 протона, і додатково, але не обмежуючись цим, містить сигнатуру His-гідрофобний залишок-Asp в 2-му β -тяжі бочонка, де His бере участь у зв'язуванні металу і Asp для кислотного/основного каталізу. Ці ознаки відомі в даній галузі і згадані, наприклад, в Chan et al., Structural Basis for Substrate Specificity in Phosphate Binding (beta/alpha)₈-Barrels: D-Allulose 6-Phosphate 3-Epimerase from Escherichia coli K-12. Biochemistry, 2008; 47 (36); 9608-9617. Переважно, епімераза для використання в способах за винаходом містить домен (α/β)₈-бочонка для каталізу, Ser на кінці 7-го β -тяжа бочонка, Ser на кінці 8-го β -тяжа бочонка, Gly у петлі активного центра, His в 2-му і 3-му β -тяжах бочонка, Asp в 2-му і 7-му β -тяжах бочонка і сигнатуру His-гідрофобний залишок-Asp в 2-му β -тяжі бочонка.

[26] Способи за винаходом використовують фосфатази, які перетворюють A6P в алюлозу (D-алюлозу). У деяких аспектах винаходу, фосфатази, що придатні для способу для того, щоб перетворювати A6P в алюлозу, містять амінокислотну послідовність, яка має ступінь ідентичності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 9 щонайменше 45 %, більш переважно щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 55 %, більш переважно щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 %, більш переважно щонайменше 75 %, більш переважно щонайменше 80 %, більш переважно щонайменше 85 %, навіть більш переважно щонайменше 90 %, найбільш переважно щонайменше 95 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 % або щонайменше 94 % і навіть найбільш переважно щонайменше 96, 97, 98, 99 або 100 %. Придатні епімерази кодує полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка має ступінь ідентичності з нуклеотидною послідовністю з SEQ ID NO: 7 і 8 щонайменше 30 %, переважно щонайменше 35 %, більш переважно щонайменше 40 %, більш переважно щонайменше 45 %, більш переважно щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 55 %, більш переважно щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, більш переважно щонайменше 70 %, більш переважно щонайменше 75 %, більш переважно щонайменше 80 %, більш переважно щонайменше 85 %, найбільш переважно щонайменше 90 %, найбільш переважно щонайменше 95 % і навіть найбільш переважно щонайменше 96, 97, 98, 99 або 100 %.

[27] Приклади A6PP включають, але не обмежуючись цим, наступні білки, ідентифіковані за номерами UNIPROT ID: A3DC21, Q5LGR4 і Q89ZR1. A3DC21 на 46 % ідентичний Q5LGR4 і на 45 % ідентичний Q89ZR1, і кожний білок каталізує специфічне дефосфорилювання A6P до алюлози. Навпаки, інші фосфатази із суперсімейства дегідрогеназ галогенокислот, білки, ідентифіковані за номерами UNIPROT ID: H0UQ29, Q67LU4, A0A0K6IPM3, C8WSJ0, A0A151YX61 і інші, які менше ніж на 45 % ідентичні A3DC21, не каталізують специфічне дефосфорилювання A6P до алюлози.

[28] Фосфатази для перетворення A6P в алюлозу, придатні для використання в способах за

винаходом, мають специфічність до алюлозо-6-фосфату. Як використовують у даному описі, специфічність алюлозо-6-фосфату належить до наявності вищої специфічної активності відносно алюлозо-6-фосфату в порівнянні із глюкозо-1-фосфатом, глюкозо-6-фосфатом або фруктозо-6-фосфатом.

5 [29] Фосфатази для перетворення А6Р в алюлозу використовують кофактор двовалентний метал: переважно магній. У додаткових аспектах за винаходом фосфатаза містить, але не обмежуючись цим, домен з Россман-подібним укладанням для каталізу; додатково, але не обмежуючись цим, містить домен кепірування С1 для субстратної специфічності; додатково, але не обмежуючись цим, містить сигнатуру DxD в 1-му β-тяжі Россман-подібного укладання
10 для координації магнію, де другий Asp є основним кислотним/основним каталізатором; додатково, але не обмежуючись цим, містить Thr або Ser на кінці 2-го β-тяжа Россман-подібного укладання, що сприяє стабільності проміжних продуктів реакції; додатково, але не обмежуючись цим, містить Lys на N-кінці α-спіралі ближче до C-кінця відносно 3-го β-тяжа Россман-подібного укладання, що сприяє стабільності проміжних продуктів реакції; і додатково, але не
15 обмежуючись цим, містить сигнатуру GDxxxD на кінці 4-го β-тяжа Россман-подібного укладання для координації магнію. Ці ознаки відомі в даній галузі і згадані, наприклад, в Burroughs et al., Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. J. Mol. Biol. 2006; 361; 1003-1034. Переважно, фосфатаза для перетворення А6Р в алюлозу, використовується в
20 способах за винаходом, містить домен з Россман-подібним укладанням для каталізу, домен кепірування С1, сигнатуру DxD в 1-му β-тяжі Россман-подібного укладання, Thr або Ser на кінці 2-го β-тяжа Россман-подібного укладання, Lys на N-кінці α-спіралі ближче до C-кінця відносно 3-го β-тяжа Россман-подібного укладання і сигнатуру GDxxxD на кінці 4-го β-тяжа Россман-подібного укладання.

25 [30] У деяких варіантах здійснення способу одержання алюлози відповідно до винаходу також включає стадію ферментативного перетворення глюкозо-6-фосфату (G6P) в F6P, і цю стадію каталізують за допомогою фосфоглюкоізомерази (PGI). В інших варіантах здійснення способу одержання алюлози додатково включає стадію перетворення глюкозо-1-фосфату (G1P) в G6P, де стадію каталізують за допомогою фосфоглюкомутази (PGM). В інших варіантах здійснення
30 способу одержання алюлози також включає стадію перетворення сахариду в G1P, яку каталізує щонайменше один фермент.

[31] Отже, спосіб одержання алюлози, відповідно до винаходу, може включати, наприклад, наступні стадії: (i) перетворення сахариду в глюкозо-1-фосфат (G1P) з використанням одного або декількох ферментів; (ii) перетворення G1P в G6P з використанням фосфоглюкомутази
35 (PGM, ЕС 5.4.2.2); (iii) перетворення G6P в F6P з використанням фосфоглюкоізомерази (PGI, ЕС 5.3.1.9); (iv) перетворення F6P в А6Р через А6РЕ; і (v) перетворення А6Р в алюлозу через А6РР. Приклад способу, де сахаридом є крохмаль, показаний на фіг. 2.

[32] Звичайно, співвідношення одиниць ферменту, використовуваного в розкритому способі, становлять 1:1:1:1 (αGP:PGM:PGI:А6РЕ:А6РР). Для того, щоб оптимізувати вихід продукту, ці співвідношення можна коректувати в будь-якій кількості комбінацій. Наприклад, співвідношення
40 3:1:1:1:1 можна використовувати для того, щоб максимізувати концентрацію фосфорилуваних проміжних продуктів, що приведе до збільшеної активності наступних реакцій. Навпаки, співвідношення 1:1:1:1:3 можна використовувати для того, щоб підтримувати стійке постачання фосфатом для αGP, що приведе до ефективнішого фосфоролітичного розщеплення α-1,4-глікозидних зв'язків. Співвідношення ферментів, наприклад, 3:1:1:1:3 можна використовувати
45 для того, щоб додатково збільшувати швидкість реакції. Отже, співвідношення ферментів, включаючи інші необов'язкові ферменти, розглянуті далі, можна варіювати для збільшення ефективності одержання алюлози. Наприклад, конкретний фермент може бути присутнім у кількості приблизно 2×, 3×, 4×, 5× і т. ін. відносно кількості інших ферментів.

50 [33] Однією з важливих переваг способів є те, що стадії способу можна проводити в одному біореакторі або реакційній посудині. Альтернативно, стадії також можна проводити в множині біореакторів або реакційних посудин, які розташовані послідовно.

[34] Потім іони фосфату, утворені при дефосфорилуванні А6Р, можна використовувати повторно в способі на стадії перетворення сахариду в G1P, зокрема, коли всі стадії способу
55 проводять в одному біореакторі або реакційній посудині. Здатність повторно використовувати фосфат у розкритих способах робить можливими нестехіометричні кількості фосфату, що підлягає використанню, що зберігає низькі концентрації фосфату в реакції. Це порушує загальний шлях і загальну швидкість способів, але не обмежує активність індивідуальних ферментів і допускає загальну ефективність способів одержання алюлози.

60 [35] Наприклад, концентрації фосфату в реакції можуть знаходитись в діапазоні приблизно

від 0 мМ приблизно до 300 мМ, приблизно від 0 мМ приблизно до 150 мМ, приблизно від 1 мМ приблизно до 50 мМ, переважно приблизно від 5 мМ приблизно до 50 мМ або більш переважно приблизно від 10 мМ приблизно до 50 мМ. Наприклад, концентрація фосфату в реакції може становити приблизно 0,1 мМ, приблизно 0,5 мМ, приблизно 1 мМ, приблизно 1,5 мМ, приблизно 2 мМ, приблизно 2,5 мМ, приблизно 5 мМ, приблизно 6 мМ, приблизно 7 мМ, приблизно 8 мМ, приблизно 9 мМ, приблизно 10 мМ, приблизно 15 мМ, приблизно 20 мМ, приблизно 25 мМ, приблизно 30 мМ, приблизно 35 мМ, приблизно 40 мМ, приблизно 45 мМ, приблизно 50 мМ або приблизно 55 мМ.

[36] Отже, низька концентрація фосфату веде до зниженої вартості виробництва через низький загальний фосфат і, таким чином, зниженої вартості видалення фосфату. Також це перешкоджає інгібуванню А6РР високими концентраціями вільного фосфату і знижує потенціал забруднення фосфатами.

[37] Крім того, способи, розкриті в даному описі, можна проводити без додавання АТФ як джерела фосфату, тобто без АТФ. Способи також можна проводити без необхідності додавати NAD(H), тобто без NAD(H). Інші переваги також включають той факт, що щонайменше одна стадія розкритих способів одержання алюлози включає енергетично сприятливу хімічну реакцію (фіг. 7).

[38] Приклади ферментів, використовуваних для того, щоб перетворювати сахарид в G1P, включають α -глюканфосфорилазу (α GP, EC 2.4.1.1, яка також включає мальтодекстринфосфорилазу, крохмальфосфорилазу, глікогенфосфорилазу і інші фосфорилази, що руйнують α -1,4-глікозидні зв'язки), мальтозофосфорилазу (MP, EC 2.4.1.8), целюлозфосфорилазу (CDP, EC 2.4.1.49), целобіозофосфорилазу (CBP, EC 2.4.1.20), целюлозофосфорилазу, сахарозофосфорилазу (SP, EC 2.4.1.7) і їх комбінації. Вибір ферменту або комбінації ферментів залежить від сахариду, використовуваного в способі.

[39] Сахариди, використовувані для одержання G1P, можуть являти собою полісахариди, олігосахариди і/або дисахариди. Наприклад, сахаридом може бути крохмаль, одна або декілька похідних крохмалю, целюлоза, одна або декілька похідних целюлози, сахароза, одна або декілька похідних сахарози або їх комбінації.

[40] Крохмаль є найбільш широко використовуваною сполукою накопичення енергії в природі і головним чином зберігається в насінні рослин. Природний крохмаль містить лінійну амілозу і розгалужений амілопектин. Приклади похідних крохмалю включають амілозу, амілопектин, розчинний крохмаль, амілодекстрин, мальтодекстрин, мальтозу, фруктозу і глюкозу. Приклади похідних целюлози включають попередньо оброблену біомасу, регеновану аморфну целюлозу, целюлодекстрин, целобіозу, фруктозу і глюкозу. Похідні сахарози включають фруктозу і глюкозу.

[41] Похідні крохмалю можна одержувати за допомогою ферментативного гідролізу крохмалю або за допомогою кислотного гідролізу крохмалю. Зокрема, ферментативний гідроліз крохмалю можна каталізувати або підсилювати за допомогою ізоамілази (IA, EC. 3.2.1.68), яка гідролізує α -1,-6-глюкозидні зв'язки; пулуланизи (PA, EC. 3.2.1.41), яка гідролізує α -1,6-глюкозидні зв'язки; 4- α -глюканотрансферази (4GT, EC 2.4.1.25), яка каталізує трансглікозилювання коротких мальтоолігосахаридів, даючи більш довгі мальтоолігосахариди; або α -амілази (EC 3.2.1.1), яка розщеплює α -1,4-глюкозидні зв'язки.

[42] Крім того, похідні целюлози можна одержувати за допомогою ферментативного гідролізу целюлози, каталізованого за допомогою сумішей целюлаз, за допомогою кислот або за допомогою попередньої обробки біомаси.

[43] У визначених варіантах здійснення ферменти, використовувані для того, щоб перетворювати сахарид в G1P, містять α GP. На цій стадії, коли сахариди включають крохмаль, G1P утворюють із крохмалю за допомогою α GP; коли сахариди містять розчинний крохмаль, амілодекстрин або мальтодекстрин, G1P одержують із розчинного крохмалю, амілодекстрину або мальтодекстрину за допомогою α GP.

[44] Коли сахариди включають мальтозу і ферменти містять мальтозофосфорилазу, G1P утворюють із мальтози за допомогою мальтозофосфорилази. Якщо сахариди включають сахарозу і ферменти містять сахарозофосфорилазу, G1P утворюють із сахарози за допомогою сахарозофосфорилази.

[45] У ще одному іншому варіанті здійснення, коли сахариди містять целобіозу і ферменти містять целобіозофосфорилазу, G1P утворюють із целобіози за допомогою целобіозофосфорилази.

[46] У додатковому варіанті здійснення, коли сахариди містять целюлодекстрини і ферменти містять целюлодекстринфосфорилазу, G1P утворюють із целюлодекстринів за допомогою целюлодекстринфосфорилази.

[47] В альтернативному варіанті здійснення перетворення сахариду в G1P, коли сахариди містять целюлозу і ферменти містять целюлозофосфорилазу, G1P утворюють із целюлози за допомогою целюлозофосфорилази.

5 [48] Відповідно до винаходу, алюлозу також можна одержувати із фруктози. Приклад способу показаний на фіг. 4. Наприклад, спосіб включає утворення F6P із фруктози і поліфосфату, каталізоване за допомогою поліфосфатфруктокінази (PPFK); перетворення F6P в A6P, каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою A6PP. Фруктозу можна одержувати, наприклад, за допомогою ферментативного перетворення сахарози.

10 [49] В інших варіантах здійснення алюлозу можна одержувати із сахарози. Приклад такого способу показаний на фіг. 6. Спосіб передбачає шлях синтезу *in vitro*, який включає наступні ферментативні стадії: утворення G1P із сахарози і вільного фосфату, каталізоване за допомогою сахарозофосфорилази (SP); перетворення G1P в G6P, каталізоване за допомогою PGM; перетворення G6P в F6P, каталізоване за допомогою PGI; перетворення F6P в A6P, каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою A6PP.

15 [50] Іони фосфату, утворені при перетворенні A6P в алюлозу, потім можна використовувати повторно на стадії перетворення сахарози в G1P. Додатково, як показано на фіг. 6, PPFK і поліфосфат можна використовувати для збільшення виходу алюлози за допомогою одержання F6P із фруктози, утвореної за допомогою фосфоролітичного розщеплення сахарози за допомогою SP.

20 [51] У деяких варіантах здійснення спосіб одержання алюлози включає наступні стадії: утворення глюкози з полісахаридів і олігосахаридів за допомогою ферментативного гідролізу або кислотного гідролізу, перетворення глюкози в G6P, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту, утворення фруктози з полісахаридів і олігосахаридів за допомогою ферментативного гідролізу або кислотного гідролізу, і перетворення фруктози в G6P, каталізоване за допомогою щонайменше одного ферменту. Приклади полісахаридів і олігосахаридів перераховані вище.

25 [52] В інших варіантах здійснення G6P одержують із глюкози і поліфосфату натрію за допомогою поліфосфатглюкокінази.

[53] Дане розкриття передбачає способи перетворення сахаридів, таких як полісахариди і олігосахариди в крохмалі, целюлозі, сахарозі і їх похідних продуктах, в алюлозу. У визначених варіантах здійснення штучні (неприродні) ферментативні шляхи без АТФ передбачені для того, щоб перетворювати крохмаль, целюлозу, сахарозу і їх похідні продукти в алюлозу, використовуючи безклітинні ферментативні коктейлі.

30 [54] Як показано вище, декілька ферментів можна використовувати для того, щоб гідролізувати крохмаль для збільшення виходу G1P. Такі ферменти включають ізоамілазу, пулуланазу і α -амілазу. Кукурудзяний крохмаль містить множинну гілок, які перешкоджають дії α GP. Ізоамілазу можна використовувати для дегілкування крохмалю, що дає лінійний амілодекстрин. Попередньо оброблений ізоамілазою крохмаль може привести до вищої концентрації F6P у кінцевому продукті. Ізоамілаза і пулуланаза розщеплюють α -1,6-глікозидні зв'язки, що робить можливим повніше руйнування крохмалю за допомогою α -глюканфосфорилази. α -амілаза розщеплює α -1,4-глікозидні зв'язки, отже α -амілазу використовують для того, щоб руйнувати крохмаль на фрагменти для швидшого перетворення в алюлозу.

35 [55] Як показано на фіг. 2, мальтозофосфорилазу (MP) можна використовувати для збільшення виходу алюлози за допомогою фосфоролітичного розщеплення продукту розкладання мальтози на G1P і глюкозу. Альтернативно, 4-глюкантрансферазу (4GT) можна використовувати для збільшення виходу алюлози за допомогою повторного використання продуктів розкладання глюкози, мальтози і мальтотріози на більш довгі мальтоолігосахариди; які можна фосфоролітично розщеплювати за допомогою α GP з одержанням G1P.

40 [56] Додатково, целюлоза є найпоширенішим біоресурсом і являє собою основний компонент клітинної стінки рослин. Нехарчова лігноцелюлозна біомаса містить целюлозу, геміцелюлозу і лігнін, а також інші мінорні компоненти. Чисту целюлозу, включаючи Avicel (мікрокристалічна целюлоза), регеновану аморфну целюлозу, бактеріальну целюлозу, фільтрувальний папір і т. ін., можна одержувати через ряд обробок. Частково гідролізовані целюлозні субстрати включають водонерозчинні целодекстрини, ступінь полімеризації яких більше 7, водорозчинні целодекстрини зі ступенем полімеризації 3-6, целобіозу, глюкозу і фруктозу.

45 [57] У визначених варіантах здійснення целюлозу і її похідні продукти можна перетворювати

в алюлозу через серію стадій. Приклад такого способу представлений на фіг. 3. Спосіб передбачає шлях синтезу *in vitro*, який включає наступні стадії: утворення G1P із целодекстрину і целобіози і без фосфату, каталізоване за допомогою целодекстринфосфорилази (CDP) і целобіозофосфорилази (CBP), відповідно; перетворення G1P в G6P, каталізоване за допомогою PGM; перетворення G6P в F6P, каталізоване за допомогою PGI; перетворення F6P в A6P, каталізоване за допомогою A6PE; і перетворення A6P в алюлозу, каталізоване за допомогою A6PP. У цьому способі, іони фосфату можна використовувати повторно на стадії перетворення целодекстрину і целобіози в G1P.

[58] Декілька ферментів можна використовувати для того, щоб гідролізувати тверду целюлозу до водорозчинних целодекстринів і целобіози. Такі ферменти включають ендоглюканазу і целобіогідролазу, але не включають β -глюкозидазу (целобіазу).

[59] Перед гідролізом целюлози і одержанням G1P, целюлозу і біомасу можна попередньо обробляти для збільшення їх реакційної здатності і зниження ступеня полімеризації ланцюгів целюлози. Способи попередньої обробки целюлози і біомаси включають попередню обробку розведеною кислотою, фракціонування лігноцелюлози на основі розчинників целюлози, аміачне розширення волокон, просочування аміачною водою, обробку іонною рідиною і частковий гідроліз із використанням концентрованих кислот, включаючи соляну кислоту, сірчану кислоту, фосфорну кислоту і їх комбінації.

[60] У деяких варіантах здійснення поліфосфат і поліфосфатглюкокіназу (PPGK) можна додавати в спосіб, таким чином збільшуючи вихід алюлози за допомогою фосфорилювання продукту розкладання глюкози до G6P, як показано на фіг. 3.

[61] В інших варіантах здійснення алюлозу можна утворювати із глюкози. Приклад такого способу представлений на фіг. 5. Спосіб включає стадії утворення G6P із глюкози і поліфосфату, каталізованого за допомогою поліфосфатглюкокінази (PPGK); перетворення G6P в F6P, каталізованого за допомогою PGI; перетворення F6P в A6P, каталізованого за допомогою ферменту; і перетворення A6P в алюлозу, каталізованого за допомогою A6PP.

[62] Будь-який придатний біологічний буфер, відомий у даній галузі, можна використовувати в способі за винаходом, такому як HEPES, PBS, BIS-TRIS, MOPS, DIPSO, Trizma і т. ін. Реакційний буфер для всіх варіантів здійснення може мати рН у діапазоні 5,0-8,0. Більш переважно рН реакційного буфера може знаходитись в діапазоні приблизно від 6,0 приблизно до 7,3. Наприклад, рН реакційного буфера може становити 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2 або 7,3.

[63] Реакційний буфер також може містити ключові катіони металу. Приклади іонів металів включають Mg^{2+} , Co^{2+} і Zn^{2+} .

[64] Температура реакції, при якій проводять стадії способу, може знаходитись в діапазоні 37-85 °C. Більш переважно, стадії можна проводити при температурі в діапазоні від приблизно 40 °C до приблизно 70 °C. Температура може становити, наприклад, приблизно 40 °C, приблизно 45 °C, приблизно 50 °C, приблизно 55 °C або приблизно 60 °C. Переважно, температура реакції становить приблизно 50 °C.

[65] Час реакції в розкритих способах можна коректувати в міру необхідності, і він може знаходитись в діапазоні приблизно від 8 годин до приблизно 48 годин. Наприклад, час реакції може становити приблизно 16 годин, приблизно 18 годин, приблизно 20 годин, приблизно 22 години, приблизно 24 години, приблизно 26 годин, приблизно 28 годин, приблизно 30 годин, приблизно 32 години, приблизно 34 години, приблизно 36 годин, приблизно 38 годин, приблизно 40 годин, приблизно 42 години, приблизно 44 години, приблизно 46 годин або приблизно 48 годин. Більш переважно, час реакції становить приблизно 24 години.

[66] Способи відповідно до винаходу можуть досягати високого виходу внаслідок дуже сприятливої константи рівноваги для загальної реакції. Теоретично, можна досягти виходу аж до 99 %, якщо вихідний матеріал повністю перетворюють у проміжний продукт.

[67] У способах за винаходом використовують недорогі вихідні матеріали і знижена вартість виробництва за рахунок зниження витрат, асоційованих з вихідною сировиною і виділенням продукту. Крохмаль, целюлоза, сахароза і деякі їх похідні є менш дорогою вихідною сировиною, ніж, наприклад, фруктоза. Коли алюлозу одержують із фруктози, виходи нижче, ніж у даному винаході, і алюлозу потрібно відокремлювати від фруктози через хроматографію, що призводить до вищої вартості виробництва.

[68] Також стадія перетворення A6P в алюлозу відповідно до винаходу являє собою необоротну фосфатазну реакцію, незалежно від вихідної сировини. Отже, алюлозу одержують із дуже високим виходом, при цьому ефективно мінімізуючи наступні витрати на виділення продукту.

[69] На відміну від клітинних способів виробництва, винахід включає безклітинне одержання алюлози, має відносно високу швидкість реакції через усунення клітинної мембрани, яка часто

сповільнює транспорт субстрату/продукту в клітину і з неї. Також він має кінцевий продукт, вільний від ферментаційних середовищ, багатих живильними речовинами/клітинних метаболітів.

ПРИКЛАДИ

5 Матеріали і способи

[70] Хімічні сполуки

[71] Усі хімічні сполуки, включаючи кукурудзяний крохмаль, розчинний крохмаль, мальтодекстрини, мальтозу, глюкозу, фільтрувальний папір, мали марку реактивів або вище і
 10 були придбані в Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) або Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA), якщо не зазначене інше. Рестрикційні ферменти, T4 лігазу і ДНК-полімеразу Phusion придбавали в New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Олігонуклеотиди синтезували або за допомогою Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA), або Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA). Нуклеотидна послідовність SEQ ID NO:1 кодує термофільну A6PE з *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4). SEQ ID NO:2 являє собою
 15 версію цієї нуклеотидної послідовності з оптимізованими кодонами. SEQ ID NO:3 являє собою амінокислотну послідовність для ферменту. Нуклеотидна послідовність SEQ ID NO:4 кодує термофільну A6PE з *Bacillus thermoamylovorans* (UNIPROT ID A0A090IXZ8). SEQ ID NO:5 являє собою версію з оптимізованими кодонами цієї нуклеотидної послідовності. SEQ ID NO:6 являє собою амінокислотну послідовність для ферменту. Нуклеотидна послідовність SEQ ID NO:7 кодує термофільну A6PP з *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DC21). SEQ ID NO:8 являє собою версію нуклеотидної послідовності з оптимізованими кодонами. SEQ ID NO:9 являє собою амінокислотну послідовність, відповідну ферменту. Регеновану аморфну целюлозу, використовувану при ферментативному очищенні, одержували з Avicel PH105 (FMC BioPolymer, Philadelphia, PA, USA), через її розчинення і регенерацію, як описано в Ye et al., Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of *Clostridium thermocellum* cellodextrin phosphorylase on insoluble cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011; 92:551-560. *Escherichia coli* Sig10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) використовували як клітину-хазяїна для маніпуляцій із ДНК, а *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) використовували як клітину-хазяїна для експресії рекомбінантного білка. Середовища ZYM-5052, що містять 100 мг/л⁻¹ ампіциліну або 50 мг/л⁻¹ канаміцину, використовували для клітинного росту *E. coli* і експресії рекомбінантного білка. Целюлазу з *Trichoderma reesei* (номер за каталогом: C2730) і пулулазу (номер за каталогом: P1067) придбали в Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) і одержували за допомогою Novozymes (Franklinton, NC, USA). Мальтозофосфорилазу (номер за каталогом: M8284) придбали в Sigma-Aldrich.

35 [72] Одержання і очищення рекомбінантних ферментів

[73] Штам *E. coli* BL21 (DE3), що несе експресуючу білок плазміду, інкубували в 1 л колбі Ерленмейера з 100 мл середовищ ZYM-5052, що містять 100 мг/л⁻¹ ампіциліну або 50 мг/л⁻¹ канаміцину. Клітини вирощували при 30 °C при обертальному струшуванні на 220 об./хв. протягом 16-24 годин. Клітини збирали за допомогою центрифугування при 12 °C і промивали
 40 один раз із використанням 20 мМ HEPES (pH 7,5), що містить 50 мМ NaCl і 5 мМ MgCl₂ (термопреципітація і целюлозав'язуючий модуль), або 20 мМ HEPES (pH 7,5), що містить 300 мМ NaCl і 5 мМ імідазолу (Ni очищення). Клітинні пелети ресуспендували в тому ж буфері і лізували за допомогою обробки ультразвуком (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 500; ввімк. імпульс 5 с і вимк. 10 с, усього 21 хв. при 50 % амплітуді). Після центрифугування очищали цільові білки в супернатантах.

[74] Три підходи використовували для того, щоб очищати різні рекомбінантні білки. Білки з гістидиновими мітками очищали за допомогою Profinity IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Злиті білки, що містять целюлозав'язуючий модуль (CBM) і самовирізний інтеїн, очищали через високоафінну адсорбцію на поверхні регенованої аморфної целюлози великої площі. Термопреципітацію при 70-95 °C протягом 5-30 хв. використовували для того, щоб очищати гіпертермостабільні ферменти. Чистоту рекомбінантних білків досліджували за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE). A6PE очищали з використанням 80 мкМ CoCl₂, присутнього в середовищах для вирощування, елююючих буферах, діалізному буфері і буфері для зберігання білка.

55 [75] Використовувані ферменти і аналіз їх активності

[76] Використовували α-глюканфосфорилазу (αGP) з *Thermotoga maritima* (UNIPROT ID G4FEN8). Активність аналізували в 50 мМ натрійфосфатному буфері (pH 7,2), що містить 1 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT і 30 мМ мальтодекстрину при 50 °C. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO) (Vivaproducts, Inc., Littleton, MA, USA). Глюкозо-1-фосфат (G1P) вимірювали з використанням набору для аналізу із

глюкозогексокіназою/G6PDH (Sigma Aldrich, № за каталогом GАНK20-1КТ) з додаванням 25 Од/мл фосфоглюкомутази. Одиниця (Од) описана як мкмоль/хв.

[77] Використовували фосфоглюкомутазу (PGM) *Thermococcus kodakaraensis* (UNIPROT ID Q68BJ6). Активність вимірювали в 50 мМ буфері HEPES (pH 7,2), що містить 5 мМ MgCl₂ і 5 мМ G1P, при 50 °С. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, глюкозо-6-фосфат (G6P), визначали з використанням набору для аналізу з гексокіназою/G6PDH (Sigma Aldrich, № за каталогом GАНK20-1КТ).

[78] Використовували два різні джерела фосфоглюкоізомерази (PGI) з *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DBX9) і *Thermus thermophilus* (UNIPROT ID Q5SLL6). Активність вимірювали в 50 мМ буфера HEPES (pH 7,2), що містить 5 мМ MgCl₂ і 10 мМ G6P, при 50 °С. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, фруктозо-6-фосфат (F6P), визначали з використанням сполученого ферментативного аналізу із фруктозо-6-фосфаткіназою (F6PK)/піруватдегідрогеназою (PK)/лактатдегідрогеназою (LD), де зниження поглинання на 340 нм указує на одержання F6P. Ця 200 мкл реакція містила 50 мМ HEPES (pH 7,2), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ G6P, 1,5 мМ АТФ, 1,5 мМ фосфоенолпірувату, 200 мкМ NADH, 0,1 Од PGI, 5 Од PK і 5 Од LD.

[79] Використовували алюлозо-6-фосфат-3-епімерази (A6PE) з *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UNIPROT ID D9TQJ4), SEQ ID NO:3. Активність вимірювали в 50 мМ буфері HEPES (pH 7,2), що містить 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 1 Од/мл A6PP і 10 мМ F6P, при 50 °С. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, алюлозо-6-фосфат (A6P), визначали з використанням алюлозо-6-фосфатфосфатази і виявляючи вивільнення вільного фосфату. Для того, щоб виявляти вивільнення вільного фосфату, 500 мкл розчину, що містить 0,1 М ацетату цинку і 2 мМ молібдату амонію (pH 5), додавали до 50 мкл реакції. Їх змішували, після чого йшло 125 мкл 5 % аскорбінової кислоти (pH 5). Цей розчин змішували, потім інкубували при 30 °С протягом 20 хв. Поглинання на 850 нм зчитували для того, щоб визначати вивільнення вільного фосфату.

[80] Використовували алюлозо-6-фосфатфосфатазу (A6PP) з *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DC21), SEQ ID NO:9. Активність вимірювали в 50 мМ буфері HEPES (pH 7,2), що містить 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 1 Од/мл A6PE і 10 мМ F6P, при 50 °С. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, алюлозу, визначали через виявлення вивільнення вільного фосфату, як описано для A6PE.

[81] Рекомбінантна целодекстринфосфорилаза і целобіозофосфорилаза з *C. thermocellum* описані в Ye et al. Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails. *ChemSusChem* 2009; 2:149-152. Їх активності аналізували, як описано.

[82] Рекомбінантна поліфосфатглюкокіназа з *Thermobifida fusca* YX описана в Liao et al., One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 93:1109-1117. Її активності аналізували, як описано.

[83] Рекомбінантна ізоамілаза з *Sulfolobus tokodaii* описана в Cheng et al., Doubling power output of starch biobattery treated by the most thermostable isoamylase from an archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Scientific Reports* 2015; 5:13184. Її активності аналізували, як описано.

[84] Рекомбінантна 4-α-глюканолтрансфераза з *Thermococcus litoralis* описана в Jeon et al. 4-α-Glucanotransferase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus Litoralis*. *Eur. J. Biochem.* 1997; 248:171-178. Її активність вимірювали, як описано.

[85] Використовували сахарозофосфорилазу з *Caldithrix abyssi* (UNIPROT H1XT50). Її активність вимірювали в 50 мМ буфері HEPES (pH 7,5), що містить 10 мМ сахарози і 12 мМ органічного фосфату. Глюкозо-1-фосфат (G1P) вимірювали з використанням набору для аналізу із глюкозогексокіназою/G6PDH з додаванням 25 Од/мл фосфоглюкомутази, як і у випадку α-глюканфосфорилази.

[86] Одиниці ферменту, використовованого в кожному прикладі далі, можна збільшувати або зменшувати, щоб коректувати час реакції за бажанням. Наприклад, якщо бажать здійснювати приклад 9 за 8 год. замість 24 год., одиниці ферменту слід збільшувати приблизно в 3 рази. Навпаки, якщо бажать виконувати приклад 9 за 48 год. замість 24 год., одиниці ферменту слід зменшувати приблизно в 2 рази. Ці приклади ілюструють, як кількість одиниць ферменту можна використовувати для збільшення або зменшення часу реакції при збереженні постійної продуктивності.

[87] Приклад 1

[88] Для того, щоб валідувати технічну здійсненність ферментативного біосинтезу фруктозо-6-фосфату із крохмалю, рекомбінантно експресували три ферменти: α -глюканфосфорилазу з *T. maritima* (UNIPROT ID G4FEH8), фосфоглюкомутазу з *Thermococcus kodakaraensis* (UNIPROT ID Q68BJ6) і фосфоглюкоізомеразу з *Clostridium thermocellum* (UNIPROT ID A3DBX9).
5 Рекомбінантні білки надекспресували в *E. coli* BL21 (DE3) і очищали, як описано вище.

[89] 0,20 мл реакційної суміші, що містить 10 г/л розчинного крохмалю, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ $ZnCl_2$, 0,01 Од α GP, 0,01 Од PGM і 0,01 Од PGI, інкубували при 50 °С протягом 24 годин. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, фруктозо-6-фосфат (F6P), визначали з використанням сполученого ферментативного аналізу із фруктозо-6-фосфаткіназою (F6PK)/піруватдегідрогеназою (PK)/лактатдегідрогеназою (LD), де зниження поглинання на 340 нм указує на одержання F6P, як описано вище. Кінцева концентрація F6P після 24 годин становила 3,6 г/л.

[90] Приклад 2

[91] Ті ж тести, як у прикладі 1 (крім температури реакції), здійснювали при 40-80 °С. Виявлено, що 10 г/л розчинного крохмалю давали 0,9 г/л F6P при 40 °С і 3,6 г/л F6P при 80 °С після 40-годинних реакцій. Ці результати підказують, що збільшення температури реакції для цього набору ферментів збільшувало вихід F6P, але занадто висока температура може знижувати активність деяких ферментів.

[92] Приклад 3

[93] Виявлено, при 80 °С співвідношення одиниць ферментів α GP:PGM:PGI приблизно 1:1:1 приводило до швидкого утворення F6P. Відзначали, що співвідношення ферментів не впливає на кінцеву концентрацію F6P значно, якщо час реакції достатньо великий. Однак співвідношення ферментів впливає на швидкості реакцій і загальну вартість ферментів, використовуваних у системі.

[94] Приклад 4

[95] 0,20 мл реакційну суміш, що містить 10 г/л мальтодекстрину, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ $ZnCl_2$, 0,01 Од α GP, 0,01 Од PGM і 0,01 Од PGI, інкубували при 50 °С протягом 24 годин. Реакцію зупиняли через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Продукт, фруктозо-6-фосфат (F6P), визначали з використанням сполученого ферментативного аналізу із фруктозо-6-фосфаткіназою (F6PK)/піруватдегідрогеназою (PK)/лактатдегідрогеназою (LD), де зниження поглинання на 340 нм указує на одержання F6P, як описано вище. Кінцева концентрація F6P після 24 годин становила 3,6 г/л.

[96] Приклад 5

[97] Для того, щоб тестувати одержання F6P з Avicel, Sigma, використовували целюлазу, щоб гідролізувати целюлозу при 50 °С. Для того, щоб видаляти β -глюкозидазу з комерційної целюлази, 10 одиниць фільтрувального паперу/мл целюлази змішували з 10 г/л Avicel на водно-льодяній бані протягом 10 хв. Після центрифугування при 4 °С, декантували супернатант, що містить β -глюкозидазу. Наявний Avicel зв'язували із целюлазовмісною ендоглюканазою і целобіогідролазою, ресуспендували в цитратному буфері (рН 4,8) для гідролізу при 50 °С протягом 3 діб. Гідролізат целюлози змішували з 5 Од/мл целодекстринфосфорилази, 5 Од/л целобіозофосфорилази, 5 Од/мл α GP, 5 Од/мл PGM і 5 Од/мл PGI в 100 мМ буфері HEPES (рН 7,2), що містить 10 мМ фосфату, 5 мМ $MgCl_2$ і 0,5 мМ $ZnCl_2$. Реакцію проводили при 60 °С протягом 72 годин і виявляли високі концентрації F6P (невеликі кількості глюкози і без целобіози). F6P виявляли з використанням сполученого ферментативного аналізу, описаного вище. Глюкозу виявляли з використанням набору для аналізу з гексокіназою/G6PDH, як описано вище.

[98] Приклад 6

[99] Для збільшення виходу F6Pa з Avicel, Avicel попередньо обробляли концентрованою фосфорною кислотою для одержання аморфної целюлози (RAC), як описано в 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. Для того, щоб видаляти β -глюкозидазу з комерційної целюлази, 10 одиниць фільтрувального паперу/мл целюлази змішували з 10 г/л RAC на водно-льодяній бані протягом 5 хв. Після центрифугування при 4 °С, декантували супернатант, що містить β -глюкозидазу. RAC, яку зв'язували із целюлазовмісною ендоглюканазою і целобіогідролазою, ресуспендували в цитратному буфері (рН 4,8) для гідролізу при 50 °С протягом 12 годин. Гідролізат RAC змішували з 5 Од/мл целодекстринфосфорилази, 5 Од/л целобіозофосфорилази, 5 Од/мл α GP, 5 Од/мл PGM і 5 Од/мл PGI в 100 мМ буфері HEPES (рН 7,2), що містить 10 мМ фосфату, 5 мМ $MgCl_2$ і 0,5 мМ

ZnCl₂. Реакцію проводили при 60 °С протягом 72 годин. Одержували високі концентрації F6P і глюкози, оскільки не додавали ферменти для того, щоб перетворювати глюкозу в F6P. F6P виявляли з використанням сполученого ферментативного аналізу, описаного вище. Глюкозу виявляли з використанням набору для аналізу з гексокіназою/G6PDH, як описано вище.

5 [100] Приклад 7

[101] Для того, щоб додатково збільшувати вихід F6P з RAC, додавали поліфосфатглюкокіназу і поліфосфат. Для того, щоб видаляти β-глюкозидазу з комерційної целюлази, 10 одиниць фільтрувального паперу/мл целюлази змішували з 10 г/л RAC на водно-льодяній бані протягом 5 хв. Після центрифугування при 4 °С, декантували супернатант, що містить β-глюкозидазу. RAC, яку зв'язували із целюлазовмісною ендоглюканазою і целобіогідролазою, ресуспендували в цитратному буфері (рН 4,8) для гідролізу при 50 °С, інкубували в цитратному буфері (рН 4,8) для гідролізу при 50 °С протягом 12 годин. Гідролізат RAC змішували з 5 Од/мл поліфосфатглюкокінази, 5 Од/мл целодекстринфосфорилази, 5 Од/мл целобіозофосфорилази, 5 Од/мл αGP, 5 Од/мл PGM і 5 Од/мл PGI в 100 мМ буфері HEPES (рН 7,2), що містить 50 мМ поліфосфату, 10 мМ фосфату, 5 мМ MgCl₂ і 0,5 мМ ZnCl₂. Реакцію проводили при 50 °С протягом 72 годин. F6P виявляли у високих концентраціях при лише невеликих кількостях глюкози, що були присутні тепер. F6P виявляли з використанням сполученого ферментативного аналізу, описаного вище. Глюкозу виявляли з використанням набору для аналізу з гексокіназою/G6PDH, як описано вище.

20 [102] Приклад 8

[103] Для того, щоб валідувати одержання алюлози з F6P, 2 г/л F6P змішували з 1 Од/мл A6PE і 1 Од/мл A6PP в 50 мМ буфері HEPES (рН 7,2), що містить 5 мМ MgCl₂ і 80 мкМ CoCl₂. Реакцію інкубували протягом 6 годин при 50 °С. 99 % перетворення F6P в алюлозу спостерігали через HPLC (Agilent серії 1100) з використанням колонки Agilent Hi-Plex H і детектора показника заломлення. Зразок проганяли в 5 мМ H₂SO₄ при 0,6 мл/хв.

25 [104] Приклад 9

[105] Для того, щоб валідувати одержання алюлози з мальтодекстрину, 0,20 мл реакційну суміш, що містить 20 г/л мальтодекстрину, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од αGP, 0,05 Од PGM, 0,05 Од PGI, 0,05 Од A6PE і 0,05 Од A6PP, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Реакцію зупиняють через фільтрування ферменту з використанням концентратора Vivaspin 2 (10000 MWCO). Алюлозу виявляють і кількісно визначають із використанням HPLC Agilent серії 1100 з детектором показника заломлення і колонкою Agilent Hi-Plex H. Рухома фаза являє собою 5 мМ H₂SO₄, яка йде 0,6 мл/хв. Стандарти різних концентрацій алюлози використовують для того, щоб кількісно визначати вихід за винаходом.

35 [106] Приклад 10

Реакційну суміш, що містить 200 г/л мальтодекстрину, 10 мМ ацетатного буфера (рН 5,5), 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂ і 0,1 г/л ізоамілази, інкубують при 80 °С протягом 24 годин. Це використовують для того, щоб утворювати іншу реакційну суміш, що містить 20 г/л обробленого ізоамілазою мальтодекстрину, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂, 0,05 Од αGP, 0,05 Од PGM, 0,05 Од PGI, 0,05 Од A6PE і 0,05 Од A6PP, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

[107] Приклад 11

45 Реакційну суміш, що містить 200 г/л мальтодекстрину, 10 мМ ацетатного буфера (рН 4,5), 5 мМ MgCl₂ і розведення пулулази Novozymes D6 1:200 інкубують при 50 °С протягом 4 годин. Це використовують для того, щоб утворювати іншу реакційну суміш, що містить 20 г/л обробленого пулулазою мальтодекстрину, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од αGP, 0,05 Од PGM, 0,05 Од PGI, 0,05 Од A6PE і 0,05 Од A6PP, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

50 [108] Приклад 12

[109] Для того, щоб додатково збільшувати вихід алюлози з мальтодекстрину, 0,05 Од 4-глюкантрансферази (4GT) додають у реакцію, описану в прикладі 9.

55 [110] 0,2 мл реакційної суміші, що містить 20 г/л обробленого ізоамілазою мальтодекстрину (див. приклад 9), 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂ 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од αGP, 0,05 Од PGM, 0,05 Од PGI, 0,05 Од A6PE, 0,05 Од A6PP і 0,05 Од 4GT, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

[111] Приклад 13

60 [112] Для того, щоб визначати діапазон концентрацій фосфатно-сольового буфера (PBS), 0,20 мл реакційної суміші, що містить 50 г/л мальтодекстрину; 6,25, 12,5, 25, 37,5 або 50 мМ

фосфатно-сольового буфера, рН 7,2; 5 мМ MgCl₂; 0,1 Од αGP; 0,1 Од PGM і 0,1 Од PGI, інкубують при 50 °С протягом 6 годин. Мала тривалість гарантує, що завершення не досягають, і, отже, можна ясно бачити відмінності в ефективності. Одержання F6P кількісно визначають із використанням сполученого ферментативного аналізу із фруктозо-6-фосфаткіназою (F6PK)/піруватдегідрогеназою (PK)/лактатдегідрогеназою (LD), де зниження поглинання на 340 нм указує на одержання F6P. Відповідно, вихід 4,5, 5,1, 5,6, 4,8 або 4,9 г/л F6P одержують для реакцій, що містять 6,25, 12,5, 25, 37,5 або 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2 (таблиця 1). Ці результати показують, що концентрація 25 мМ PBS, рН 7,2, ідеальна для цих конкретних умов реакції. Важливо відзначити, що навіть використання 6,25 мМ PBS при рН 7,2 приводить до значного обороту через повторне використання фосфату. Це показує, що розкриті способи повторного використання фосфату дозволяють зберігати низькі рівні фосфату навіть при промислових рівнях продуктивності за об'ємом (наприклад, 200-300 г/л мальтодекстрину).

Таблиця 1

Концентрація PBS, рН 7,2 (мМ)	F6P, г/л
6,25	4,5
12,5	5,1
25	5,6
37,5	4,8
50	4,9

15 [113] Приклад 14

[114] Для того, щоб визначити діапазон рН каскадної реакції, 0,20 мл реакційної суміші, що містить 50 г/л мальтодекстрину; 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0 7,2 або 7,3; 5 мМ MgCl₂; 0,02 Од αGP; 0,02 Од PGM і 0,02 Од PGI, інкубують при 50 °С протягом 16 годин. Одиниці знижують, щоб гарантувати, що завершення не досягають, і, отже, можна ясно бачити відмінності в ефективності. Одержання F6P кількісно визначають, як у прикладі 12. Відповідно, вихід 4,0, 4,1, 4,2, 4,1, 4,4, 4,1, 3,8 або 4,0 г/л F6P одержували для реакцій, що містять 50 мМ фосфатно-сольового буфера при рН 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2 або 7,3 (таблиця 2). Ці результати показують, що рН 6,8 ідеальний для цих конкретних умов реакції, незважаючи на те, що система працює в широкому діапазоні рН.

25

Таблиця 2

рН в PBS	F6P, г/л
6,0	4,0
6,2	4,1
6,4	4,2
6,6	4,1
6,8	4,4
7,0	4,1
7,2	3,8
7,3	4,0

[115] Приклад 15

30 [116] Щоб дослідити масштабування, 20 мл реакційної суміші, що містить 50 г/л обробленого ізоамілазою мальтодекстрину (див. приклад 10), 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 10 Од αGP, 10 Од PGM, 10 Од PGI, 10 Од A6PE і 10 Од A6PP, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначали, як у прикладі 9.

[117] Приклад 16

35 [118] Для того, щоб додатково збільшувати вихід алюлози з мальтодекстрину, 0,05 Од мальтозофосфорилази додають у реакцію, описану в прикладі 9.

[119] Приклад 17

[120] Для того, щоб додатково збільшувати вихід алюлози з мальтодекстрину, 0,05 Од поліфосфатглюкокінази і 75 мМ поліфосфату додають у реакцію, описану в прикладі 9.

[121] Приклад 18

40 [122] Для одержання алюлози із фруктози, реакційну суміш, що містить 10 г/л фруктози, 50

мМ буфера Tris, рН 7,0, 75 мМ поліфосфату, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од фруктозополіфосфаткінази, 0,05 Од А6РЕ і 0,05 Од А6РР, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

[123] Приклад 19

5 [124] Для одержання алюлози із глюкози, реакційну суміш, що містить 10 г/л глюкози, 50 мМ буфера Tris, рН 7,0, 75 мМ поліфосфату, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од глюкозополіфосфаткінази, 0,05 Од РGI, 0,05 Од А6РЕ і 0,05 Од А6РР, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

[125] Приклад 20

10 [126] Для одержання алюлози із сахарози, реакційну суміш, що містить 10 г/л сахарози, 50 мМ фосфатно-сольового буфера, рН 7,0, 5 мМ MgCl₂, 80 мкМ CoCl₂, 0,05 Од сахарозофосфорилази, 0,05 Од РGM, 0,05 Од РGI, 0,05 Од А6РЕ і 0,05 Од А6РР, інкубують при 50 °С протягом 24 годин. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

[127] Приклад 21

15 [128] Для того, щоб додатково збільшувати вихід алюлози із сахарози, 75 мМ поліфосфату і 0,05 Од поліфосфатфруктокінази додають у реакційну суміш у прикладі 20. Одержання алюлози кількісно визначають, як у прикладі 9.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20

1. Спосіб одержання алюлози, який включає:

перетворення фруктозо-6-фосфату (F6P) на алюлозо-6-фосфат (А6Р), каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфат-3-епімерази (А6РЕ); і

25

перетворення одержуваного А6Р на алюлозу, каталізоване за допомогою алюлозо-6-фосфат-фосфатази (А6РР).

2. Спосіб за п. 1, який додатково включає стадію перетворення глюкозо-6-фосфату (G6P) на F6P, де стадію каталізують за допомогою фосфоглюкоїзомерази (РGI).

3. Спосіб за п. 2, який додатково включає стадію перетворення глюкозо-1-фосфату (G1P) на G6P, де стадію каталізують за допомогою фосфоглюкомутази (РGM).

30

4. Спосіб за п. 3, який додатково включає стадію перетворення сахариду на G1P, де стадію каталізують за допомогою щонайменше одного ферменту, де сахарид вибирають із групи, що складається із крохмалю або його похідної, целюлози або її похідної і сахарози.

35

5. Спосіб за п. 4, у якому щонайменше один фермент вибирають із групи, що складається з - глюканфосфорилази (GP), мальтозофосфорилази, сахарозофосфорилази, целодекстринфосфорилази, целобіозофосфорилази і целюлозофосфорилази.

6. Спосіб за п. 4, у якому сахарид являє собою крохмаль або його похідну, вибрані із групи, що складається з амілози, амілопектину, розчинного крохмалю, амілодекстрину, мальтодекстрину, мальтози і глюкози.

40

7. Спосіб за п. 6, який додатково включає стадію перетворення крохмалю на похідну крохмалю, де похідну крохмалю одержують за допомогою ферментативного гідролізу крохмалю або за допомогою кислотного гідролізу крохмалю.

8. Спосіб за п. 6, який включає додавання 4-глюкантрансферази (4GT).

45

9. Спосіб за п. 7, у якому похідну крохмалю одержують за допомогою ферментативного гідролізу крохмалю, каталізованого за допомогою ізоамілази, пулуланизи, амілази або їхньої комбінації.

10. Спосіб за п. 1, який додатково включає стадію перетворення фруктози на F6P, де стадію каталізують за допомогою щонайменше одного ферменту.

11. Спосіб за п. 10, який додатково включає стадію перетворення сахарози на фруктозу, де стадію каталізують за допомогою щонайменше одного ферменту.

50

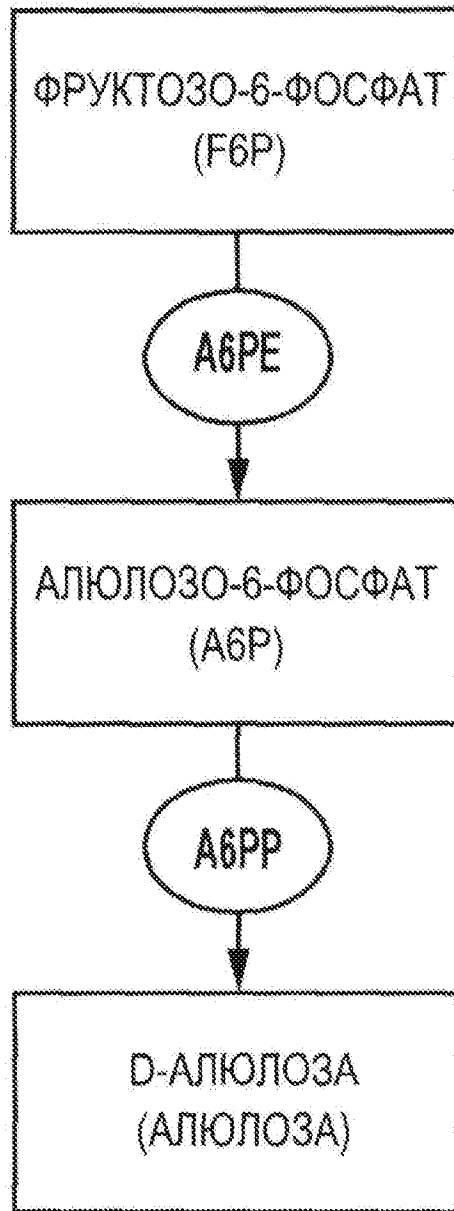
12. Спосіб за п. 2, який додатково включає стадію перетворення глюкози на G6P, де стадію каталізують за допомогою щонайменше одного ферменту.

13. Спосіб за п. 12, який додатково включає стадію перетворення сахарози на глюкозу, де стадію каталізують за допомогою щонайменше одного ферменту.

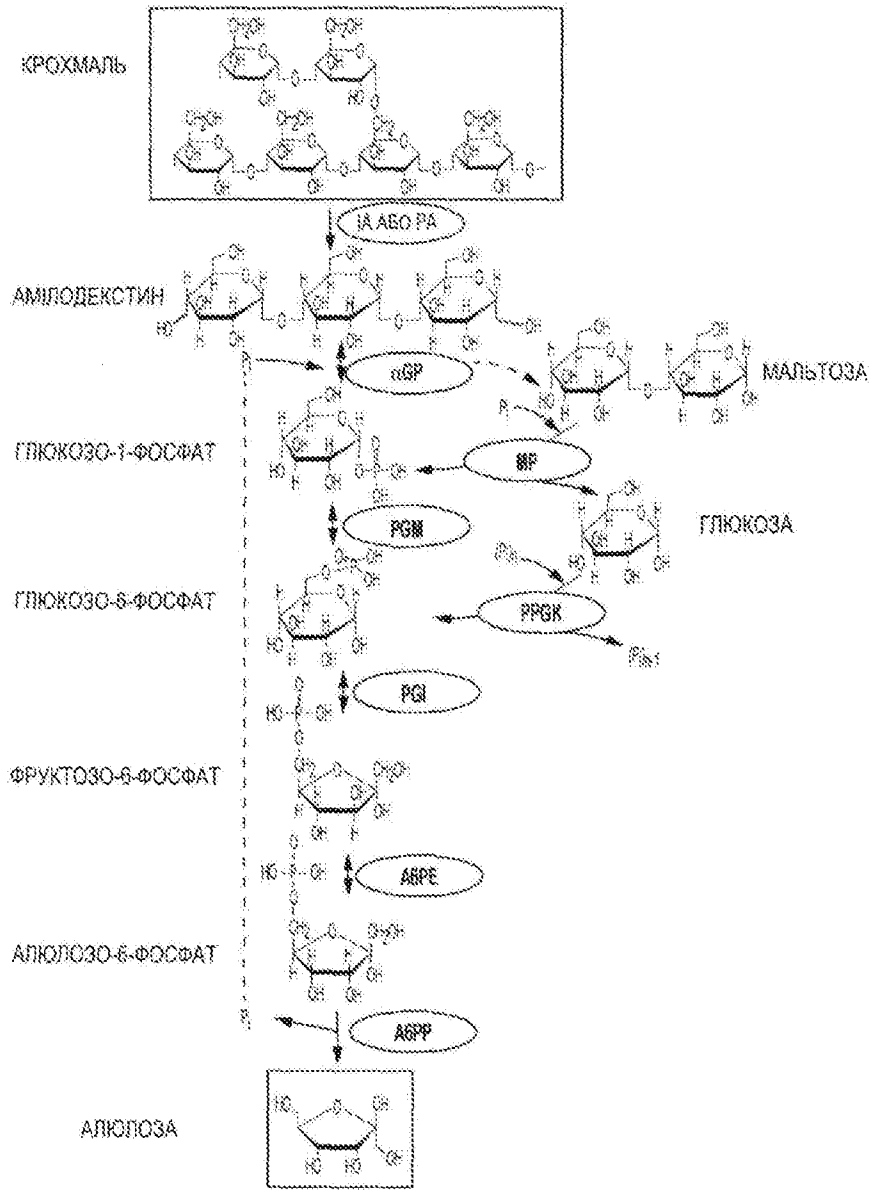
55

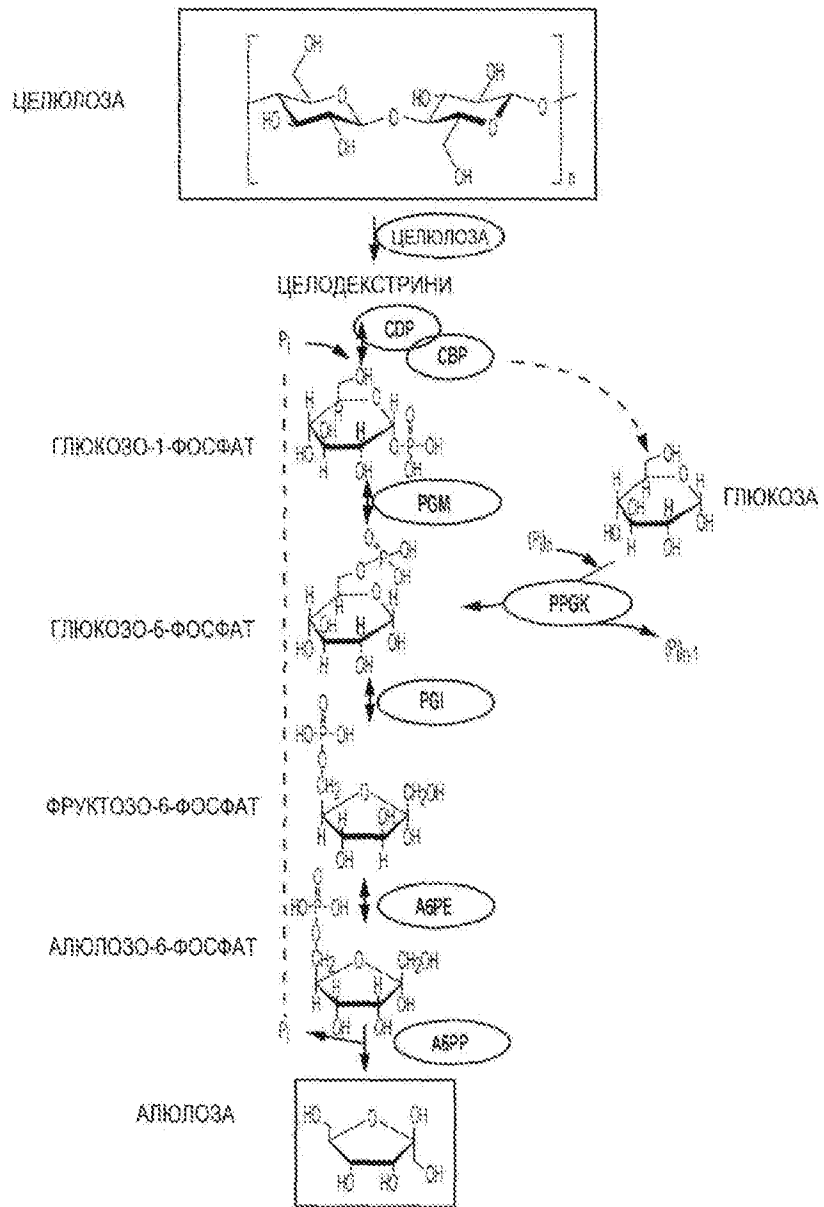
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, у якому алюлозо-6-фосфат-3-епімераза містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 45 %, щонайменше 50 %, щонайменше 55 %, щонайменше 60 %, щонайменше 65 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % або щонайменше 100 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:3 або 6, де зазначена епімераза каталізує перетворення F6P на А6Р.

15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, у якому алюлозо-6-фосфат-3-епімераза містить домен 8-бачонка для каталізу, Ser на кінці 7-го -тяжа бачонка, Ser на кінці 8-го -тяжа бачонка, Gly у петлі активного центра, His в 2-му і 3-му -тяжах бачонка, Asp в 2-му і 7-му -тяжах бачонка і сигнатуру His-гідрофобний залишок-Asp в 2-му -тяжі бачонка.
- 5 16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, у якому алюлозо-6-фосфатфосфатаза містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 45 %, щонайменше 50 %, щонайменше 55 %, щонайменше 60 %, щонайменше 65 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % або щонайменше 100 % ідентичність послідовностей з SEQ ID NO:9, де зазначені фосфати каталізують перетворення А6Р на
- 10 алюлозу.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, у якому алюлозо-6-фосфатфосфатаза містить домен з Россман-подібним укладанням для каталізу, домен кепірування С1, сигнатуру DxD в 1-му -тяжі Россман-подібного укладання, Thr або Ser на кінці 2-го -тяжа Россман-подібного укладання, Lys на N-кінці -спіралі ближче до C-кінця відносно 3-го -тяжа Россман-подібного укладання і
- 15 сигнатуру GDxxxD на кінці 4-го -тяжа Россман-подібного укладання.
18. Спосіб за будь-яким одним із пп. 1-13, у якому стадії способу проводять при температурі в діапазоні від приблизно 40 С до приблизно 70 С, при рН у діапазоні від приблизно 5,0 до приблизно 8,0 і/або протягом від приблизно 8 годин до приблизно 48 годин.
19. Спосіб за будь-яким одним із пп. 1-13, у якому стадії способу проводять в одному
- 20 біореакторі або в множині біореакторів, розташованих послідовно.
20. Спосіб за будь-яким одним із пп. 1-13, у якому стадії способу проводять без АТФ, без NAD(H), при концентрації фосфату до і включно 150 мМ, фосфат використовують повторно і/або щонайменше одна стадія способу включає енергетично сприятливу хімічну реакцію.

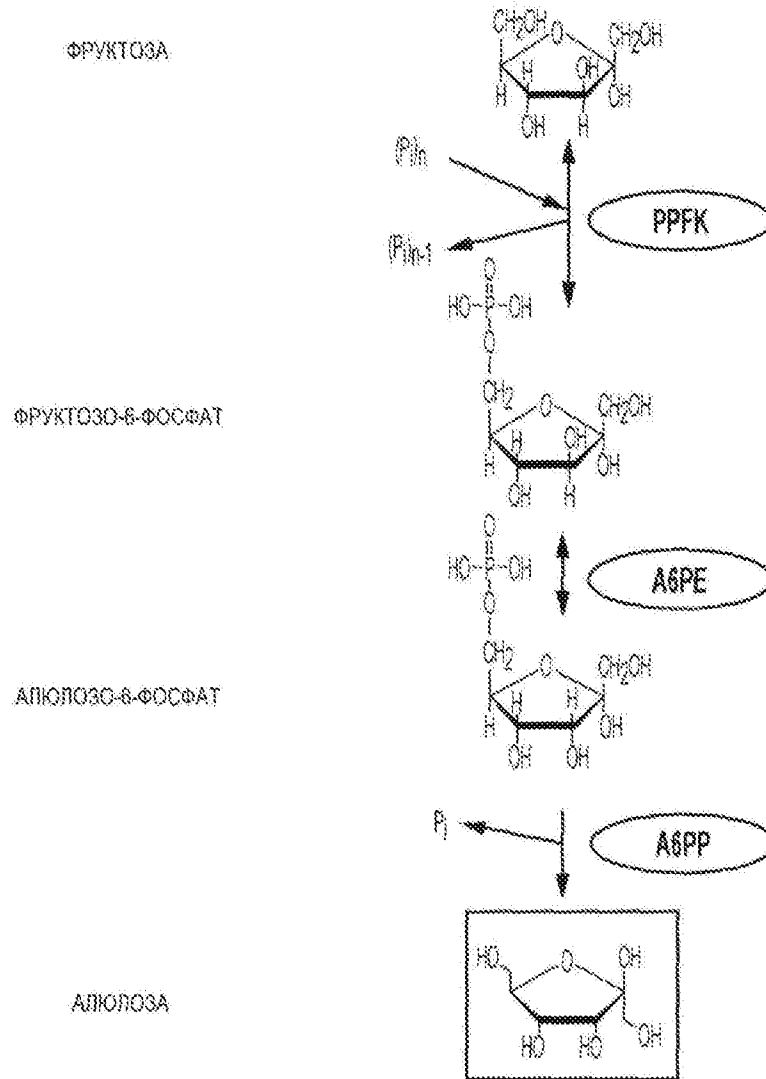


ΦΙΓ. 1

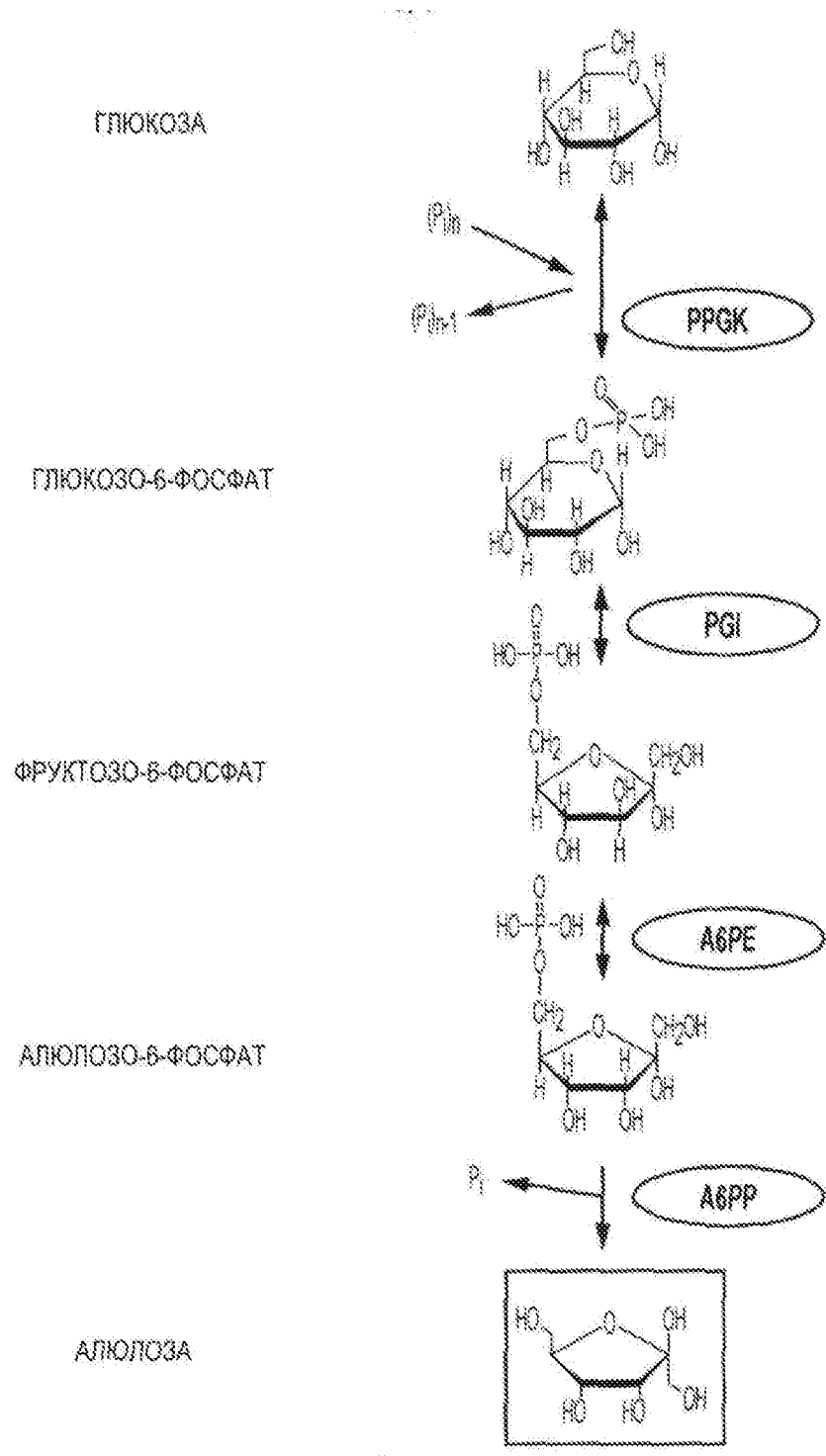




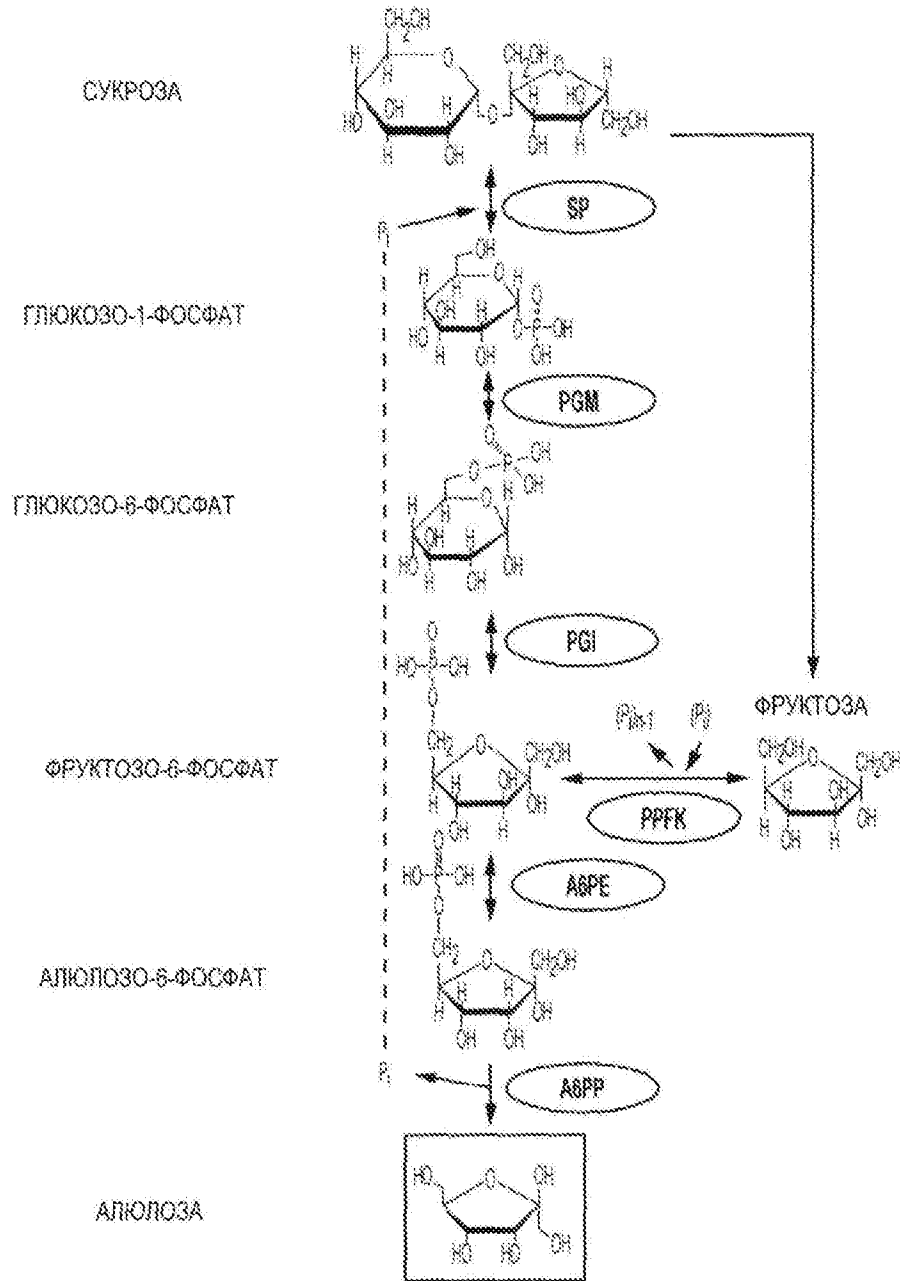
ФІГ. 3



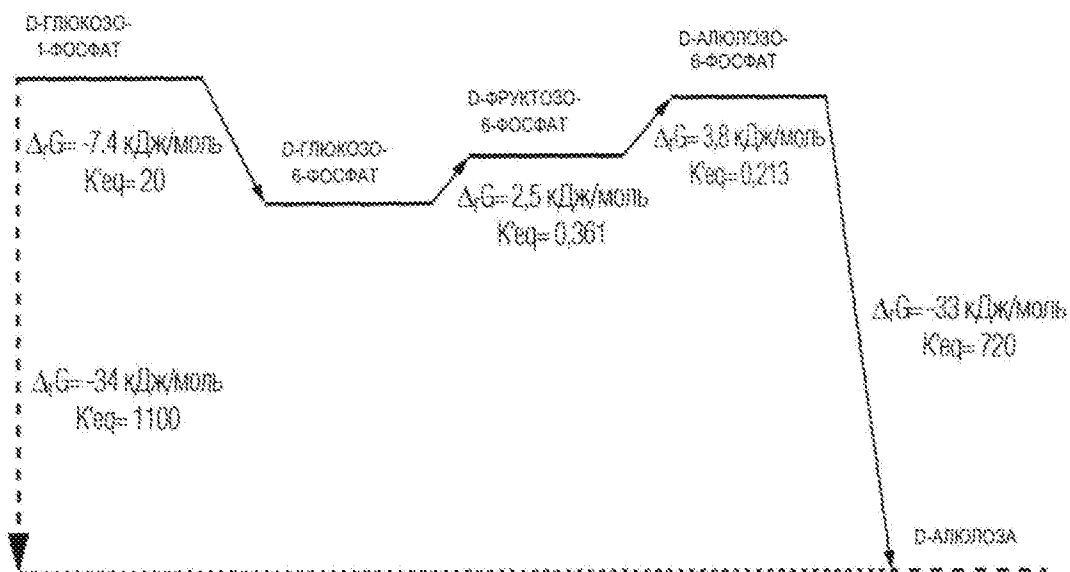
Фиг. 4



ФІГ. 5



ФІГ. 6



Фиг. 7