



(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)



1-0026468

(51)⁷ C12N 9/42; C12P 19/14

(13) B

(21) 1-2014-03067

(22) 29/01/2013

(86) PCT/JP2013/051883 29/01/2013

(87) WO 2013/121875 A1 22/08/2013

(30) PCT/JP2012/053744 17/02/2012 JP

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/02/2015 323A

(73) National University Corporation Mie University (JP)

1577, Kurimamachiya-cho, Tsu-shi, Mie 514-8507 Japan

(72) TAMARU, Yutaka (JP); KATSUYAMA, Takeshi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ETANOL TỪ XENLULOZA

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp phân hủy sinh khối mềm, phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm, và enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm. Phương pháp phân hủy sinh khối mềm này bao gồm bước đưa enzym được chọn từ exoxenlulaza, endoxenlulaza, và endoxenlulaza xử lý đặc hiệu tiếp xúc với sinh khối mềm như bã mía và rơm. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất đích, cụ thể là etanol từ sinh khối mềm bằng cách kết hợp phương pháp phân hủy sinh khối mềm làm một bước của phương pháp sản xuất này. Sáng chế còn đề cập đến enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm được chọn từ exoxenlulaza, endoxenlulaza, và endoxenlulaza xử lý cụ thể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân hủy sinh khối mềm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp phân hủy sinh khối mềm, bao gồm bước đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm, và enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất etanol từ sinh khối mềm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã có nhiều nỗ lực được thực hiện để phát triển các công nghệ sản xuất các chất hữu ích như rượu như etanol và butanol, và axit lactic bằng cách sử dụng sinh khối gỗ làm nguyên liệu thô như phoi bào gỗ hoặc sinh khối mềm như rơm và bã mía.

Việc sản xuất các chất hữu ích này từ các nguyên liệu sinh khối thô cần sự phân hủy các nguyên liệu sinh khối thô này thành đường và sau đó lên men đường thu được. Trong những năm gần đây, các nguyên liệu sinh khối thô đã được đường hóa chủ yếu nhờ các enzym. Tuy nhiên, các nguyên liệu sinh khối thô chứa nhiều tạp chất khác nhau khác xenluloza, và do đó, có vấn đề ở chỗ các enzym khó tác động đến các nguyên liệu sinh khối thô này. Khi đó, để tăng cường hiệu quả quá trình đường hóa, có các phương pháp khác nhau bao gồm, như xử lý sơ bộ, đưa các nguyên liệu sinh khối thô trải qua quá trình xử lý bằng hơi nước sử dụng axit sulfuric loãng, nước nóng áp suất cao, hoặc các phương pháp tương tự, xử lý các nguyên liệu sinh khối thô này bằng dung dịch amoniac siêu tới hạn, và các phương pháp tương tự (ví dụ, xem tài liệu sáng chế 1).

Ngoài ra, đã có những nỗ lực để phát triển các vi sinh vật hữu ích dùng cho quá trình phân hủy các nguyên liệu sinh khối thô.

Ví dụ, tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp cải thiện khả năng phân hủy xenluloza chứa trong các nguyên liệu sinh khối thô bằng cách biểu hiện

enzym thể khảm trong đó endoxenulaza (GH5) có nguồn gốc từ *Acidothermus cellulolyticus* được dung hợp với xenlobiohydrolaza (CBH) có nguồn gốc từ *Trichoderma reesei* trong *Trichoderma reesei* sản xuất xenulaza làm vật chủ.

Ngoài ra, trong khi cần thiết tiến hành bước đường hóa và bước lên men một cách độc lập để thu được chất hữu ích như etanol từ sinh khối, đã có nhiều nỗ lực để phát triển các kỹ thuật có thể tiến hành những bước này trong một bước.

Ví dụ, tài liệu sáng chế 3 bộc lộ việc tạo ra vi sinh vật có khả năng thủy phân và lên men trực tiếp sinh khối trên cơ sở lignoxenululoza bằng cách làm tăng hoạt tính của xenulaza bằng sự biến đổi. Đóng vai trò như một trong các xenulaza mà hoạt tính của nó được tăng cường, có hydrolaza được xác định trong *Clostridium phytofermentans* và các chất tương tự, và polynucleotit mã hóa hydrolaza này và các chất tương tự.

Ngoài ra, tài liệu sáng chế 4 bộc lộ kỹ thuật biểu hiện protein thể khảm bao gồm một số xenulaza thu được từ vi sinh vật không sản xuất xenulosom và vùng dockrin thu được từ vi sinh vật sản xuất xenulosom trong nấm men với mục đích tạo ra xenulosom nhân tạo. Tuy nhiên, xenulosom nhân tạo này không được tạo ra trong nấm men trong tài liệu này.

Xenulosom là phức chất enzym được tạo ra từ hai thành phần, tức là, protein lõi (CbpA) không biểu hiện hoạt tính của enzym và nhóm các enzym xenulosom. Protein lõi (CbpA) có vùng liên kết xenuloza (CBD), vùng Cohesin, và vùng tương đồng lớp bề mặt (SLH). Nhóm các enzym xenulosom có vùng dockerin để liên kết với vùng Cohesin của protein lõi (CbpA). Những thành phần này liên kết với nhau để tạo ra phức chất enzym (xenulosom), và nhờ đó, xenuloza và hemixenuloza có thể được phân hủy một cách hiệu quả.

Có thể nói rằng các vi sinh vật tạo ra xenulosom là các vi sinh vật hữu ích để phân hủy và lên men các nguyên liệu sinh khối thô. Để làm các vi sinh vật

này, *Clostridium cellulovorans* (dưới đây đôi khi được đề cập dưới dạng *C. cellulovorans*)) và các vi sinh vật tương tự là đã biết.

Clostridium cellulovorans (*C. cellulovorans*) là vi khuẩn gram dương kỵ khí ưa nhiệt độ trung bình. Các tác giả sáng chế đã khẳng định rằng *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) có kích thước hệ gen khoảng 1 Mb hoặc lớn hơn so với kích thước hệ gen của *Clostridium cellulolyticum* và *Clostridium thermocellum* thuộc cùng Chi *Clostridium* (xem, ví dụ, tài liệu phi sáng chế 1).

Hơn nữa, tài liệu phi sáng chế 2 bộc lộ rằng *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) tạo ra các chất hữu ích như axetat và butyrat bằng cách lên men mẫu thử nghiệm chứa xenlobioza và các chất tương tự và cũng gợi ý rằng có tạo ra etanol.

Ngoài ra, nhóm các enzym xenlulosom có nguồn gốc từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*), Endoglucanaza E (EngE), mà là endoxenlulaza của họ Glycosyl Hydrolaza 5 (GH5), Endoglucanaza K (EngK), mà là endoxenlulaza xử lý của họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9), Endoglucanaza H (EngH), mà là endoxenlulaza xử lý của họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9), Exoglucanase S (ExgS), mà là exoxenlulaza của họ Glycosyl Hydrolaza 48 (GH48), và các enzym tương tự, là đã biết.

Trong tài liệu này, đã bộc lộ rằng EngK ức chế hoạt tính mạnh đối với xenluloza không tan trong nước (xem, ví dụ, tài liệu phi sáng chế 3). Ngoài ra, tài liệu này cũng bộc lộ rằng mỗi hỗn hợp của ExgS và EngE, hỗn hợp của ExgS và EngH, và hỗn hợp của EngE và EngH có hoạt tính đặc hiệu đối với xenluloza dạng tinh thể so với riêng EngE, EngH, hoặc ExgS (xem, ví dụ, tài liệu phi sáng chế 4).

Như được mô tả trên đây, đã có gợi ý rằng *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) hoặc enzym hoặc nhóm các enzym thu được từ vi sinh vật này là hữu ích để phân hủy và lên men sinh khối.

Tuy nhiên, sinh khối như sinh khối gỗ và sinh khối mềm chứa các tạp chất khác nhau khác xenluloza tùy theo loại sinh khối, không giống các mẫu thử nghiệm, xenluloza không tan trong nước, xenluloza dạng tinh thể, và các chất tương tự. Do đó, sự phân hủy và lên men trực tiếp sinh khối thực (bã mía, rơm, và các loại tương tự) không phải luôn luôn thực hiện được.

Theo đó, có nhu cầu đối với phương pháp có thể phân hủy và lên men trực tiếp sinh khối thực mà không cần tiến hành bước xử lý sơ bộ và các bước tương tự cũng như cần bước đường hóa và bước lên men một cách độc lập. Cũng có nhu cầu về vi sinh vật, enzym hoặc nhóm các enzym, và các enzym tương tự có thể phân hủy và lên men sinh khối thực phù hợp với loại sinh khối.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 2008-161125 A

Tài liệu sáng chế 2: JP 2007-53050 A

Tài liệu sáng chế 3: JP 2011-529345 A

Tài liệu sáng chế 4: JP 2011-182675 A

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Y. Tamaru et al., J. Bacteriol., 192, 901-902 (2010)

Tài liệu phi sáng chế 2: ROBERT SLEAT et al., Applied và Environmental Microbiology., July 1984, p.88-93

Tài liệu phi sáng chế 3: Takamitsu Arai et al., Appl Microbiol Biotechnol 2006, 71 p,654-660

Tài liệu phi sáng chế 4: Koichiro MURASHIMA et al., Journal of Bacteriology Sept. 2002, p.5088-5095

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp có thể phân hủy một cách

thích hợp sinh khối mềm, đặc biệt sinh khối thực như bã mía hoặc rơm tùy theo loại sinh khối. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chất hữu ích như etanol làm chất đích bằng cách kết hợp phương pháp phân hủy này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất enzym hoặc dạng kết hợp của các enzym (nhóm các enzym) có thể tác động một cách hiệu quả theo loại sinh khối mềm.

Cách thức giải quyết vấn đề

Là kết quả của nghiên cứu cẩn trọng với mục đích đạt được các mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã khám phá ra rằng khi đưa enzym được chọn từ exoxenlulaza, endoxenlulaza, và endoxenlulaza xử lý đặc hiệu tiếp xúc với sinh khối mềm như bã mía và rơm, có thể phân hủy trực tiếp sinh khối thực này. Do đó, việc phát hiện này đã được phát triển thành phương pháp phân hủy sinh khối mềm của sáng chế. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã khám phá ra rằng chất hữu ích như etanol có thể được tạo ra ở dạng chất đích từ sinh khối mềm như bã mía và rơm bằng cách kết hợp phương pháp phân hủy này.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn khám phá ra rằng enzym hoặc nhóm các enzym có thể tác động một cách hiệu quả phù hợp với loại sinh khối mềm như bã mía và rơm.

Đó là, sáng chế đề cập đến phương pháp phân hủy sinh khối mềm, phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm, và enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm như được bộc lộ trong các mục từ (1) đến (20) dưới đây.

(1) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm, phương pháp này bao gồm bước đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm, enzym này bao gồm exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2.

(2) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (1) nêu trên, trong đó

exoxenlulaza bao gồm ExgS.

(3) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (1) hoặc (2) nêu trên, phương pháp này còn bao gồm bước đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm, enzym này bao gồm endoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4.

(4) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (3) nêu trên, trong đó endoxenlulaza bao gồm EngE.

(5) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó sinh khối mềm bao gồm rơm.

(6) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), phương pháp này còn bao gồm bước đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm, enzym này bao gồm endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

(7) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (6), trong đó endoxenlulaza xử lý bao gồm EngK.

(8) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (6) hoặc (7), trong đó sinh khối mềm bao gồm bã mía.

(9) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), trong đó bước đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm được tiến hành bằng cách đưa vi sinh vật sản xuất enzym bất kỳ trong số các enzym nêu trong mục 1) đến 3) dưới đây tiếp xúc với sinh khối mềm:

- 1) exoxenlulaza;
- 2) exoxenlulaza và endoxenlulaza;
- 3) exoxenlulaza, endoxenlulaza, và endoxenlulaza xử lý.

(10) Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục (9), trong đó vi sinh vật bao gồm *Clostridium cellulovorans*.

(11) Phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm, phương pháp này bao gồm bước phân hủy sinh khối mềm bằng phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10).

(12) Phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm theo mục (11), trong đó chất đích bao gồm một hoặc nhiều loại bất kỳ được chọn từ etanol, axit axetic, axit butyric, axit lactic, axit formic, và hydro.

(13) Enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm, bao gồm một hoặc nhiều loại bất kỳ trong số các mục từ 1) đến 3) sau:

- 1) exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2;
- 2) endoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4; và
- 3) endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

(14) Enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (13) nêu trên, trong đó exoxenlulaza bao gồm ExgS, endoxenlulaza bao gồm EngE, và endoxenlulaza xử lý bao gồm EngK.

(15) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (13) hoặc (14), bao gồm ít nhất các enzym nêu trong 1) và 2) sau:

- 1) exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2; và
- 2) endoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4.

(16) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (15), trong đó sinh khối mềm bao gồm rom.

(17) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (13) hoặc (14), bao gồm ít nhất một enzym nằm trong mục 1) đến 3) dưới đây:

- 1) exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2; và
- 2) endoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4; và
- 3) endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

(18) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (17), trong đó sinh khối mềm bao gồm bã mía.

(19) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (13) hoặc (14), bao gồm ít nhất các enzym nêu trong 1) và 2) sau:

- 1) exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2; và
- 2) endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

(20) Nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm theo mục (13) hoặc (14), bao gồm ít nhất các enzym nêu trong 1) và 2) sau ở tỷ lệ từ 5:95 đến 95:5:

- 1) exoxenlulaza chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2; và
- 2) endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo phương án của sáng chế, có thể phân hủy một cách trực tiếp sinh khối mềm bằng phương pháp đơn giản mà không cần xử lý sơ bộ và các công đoạn tương tự và tạo ra chất hữu ích như etanol. Hơn nữa, theo phương án của sáng chế, cũng có thể đề xuất enzym hoặc nhóm các enzym có khả năng tác động một cách hữu ích, phù hợp với loại sinh khối mềm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là đồ thị thể hiện kết quả sản xuất hợp chất đích sử dụng sinh khối mềm làm nguyên liệu thô trong *C. cellulovorans* (Ví dụ 1).

FIG.2 là hình vẽ thể hiện kết quả của phương pháp SDS-PAGE (Ví dụ 2).

FIG.3A là hình vẽ thể hiện kết quả của phương pháp nhuộm màu CBB (Ví dụ 3). FIG.3B là hình vẽ thể hiện kết quả của phương pháp thẩm tách miễn dịch (western blotting) (Ví dụ 3).

FIG.4 là hình vẽ thể hiện kết quả về hoạt tính định lượng của enzym đối với p-nitrophenyl- β -glucosid (Ví dụ 3).

FIG.5 là đồ thị thể hiện các kết quả đánh giá hoạt tính của ASC (Ví dụ 3).

FIG.6 là các đồ thị thể hiện các kết quả về tác dụng hiệp đồng của các enzym (Ví dụ 4).

FIG.7 là đồ thị thể hiện các kết quả về tác dụng hiệp đồng của các enzym với sự có mặt của xenlobioza (Ví dụ 5).

Mô tả chi tiết sáng chế

“Phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế đề cập đến phương pháp phân hủy xenluloza chứa trong sinh khối mềm đã biết rõ như rơm và bã mía bởi enzym.

“Phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế là “phương pháp phân hủy sinh khối mềm” bao gồm bước đưa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” tiếp xúc với sinh khối mềm, và có thể còn bao gồm các bước khác.

Hiện tại, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” trong “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” có nghĩa là trình tự axit amin trong đó 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 98% hoặc lớn hơn, vẫn tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn các gốc axit amin là

giống với các gốc của trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 khi trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 và trình tự axit amin khác trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 được so sánh với nhau bằng cách sắp xếp thẳng hàng các trình tự này sao cho số lượng lớn nhất có thể của các gốc axit amin khớp nhau. Ở đây, trong cách sắp xếp các trình tự axit amin, khoảng trống có thể được bao gồm để tạo ra độ đồng nhất lớn nhất.

Hơn nữa, trong khi “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” là trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, “trình tự axit amin có độ đồng nhất” theo sáng chế cũng có thể bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn và trình tự axit amin có độ đồng nhất 85% hoặc lớn hơn. Đặc biệt, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” là được ưu tiên làm trình tự axit amin.

Hơn nữa, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” có thể bao gồm “trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung”. Ví dụ được ưu tiên về trình tự axit amin như vậy là trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 làm tiêu chuẩn. Các ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, hoặc 5 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung.

Để làm enzym có trình tự axit amin như vậy, có thể đề cập đến ExgS của họ Glycosyl Hydrolaza 48 (GH48) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*), ví dụ, như “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”.

ExgS được mã hóa bởi trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 1. Trong sáng chế, “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” có thể được

xác định cũng bởi trình tự bazơ. Các ví dụ về trình tự bazơ mã hóa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” của sáng chế cũng bao gồm trình tự bazơ có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 85% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, và trình tự bazơ có độ đồng nhất 95% hoặc lớn hơn so với trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 1 miễn sao chúng là các trình tự bazơ mã hóa exoxenlulaza.

Hơn nữa, “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế có thể là “phương pháp phân hủy sinh khối” bao gồm bước đưa “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm, và có thể còn bao gồm các bước khác.

Ở đây, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” trong “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” có nghĩa là trình tự axit amin trong đó 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 98% hoặc lớn hơn, vẫn tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn các gốc axit amin là giống nhau so với các gốc axit amin của trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 khi trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 và trình tự axit amin khác trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 được so sánh với nhau bằng cách sắp xếp thẳng hàng các trình tự này sao cho số lượng lớn nhất có thể của các gốc axit amin khớp nhau. Ở đây, trong sự sắp xếp các trình tự axit amin, khoảng trống có thể được bao gồm để tạo ra độ đồng nhất lớn nhất.

Hơn nữa, trong khi “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” có thể là trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, “trình tự axit amin có độ đồng nhất” theo sáng chế cũng có thể bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn và trình tự axit amin có độ đồng nhất 85%

hoặc lớn hơn. Đặc biệt, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” là được ưu tiên làm trình tự axit amin này.

Ngoài ra, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” có thể bao gồm “trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung”. Ví dụ được ưu tiên về trình tự axit amin như vậy là trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 làm tiêu chuẩn. Ví dụ được ưu tiên hơn là trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, hoặc 5 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung.

Đề cập đến enzyme có trình tự axit amin như vậy, có thể đề cập đến EngE của họ Glycosyl Hydrolaza 5 (GH5) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*), ví dụ, như “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”.

EngE được mã hóa bởi trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 3. Theo sáng chế, “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” có thể được xác định cũng bởi trình tự bazơ. Các ví dụ về trình tự bazơ mã hóa “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” của sáng chế cũng bao gồm trình tự bazơ có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 85% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, và trình tự bazơ có độ đồng nhất 95% hoặc lớn hơn so với trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 3 miễn sao chúng là các trình tự bazơ mã hóa endoxenlulaza.

Ngoài ra, “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế có thể là “phương pháp phân hủy sinh khối” bao gồm bước đưa “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin

được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm, và có thể còn bao gồm các bước khác.

Hiện tại, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” trong “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” có nghĩa là trình tự axit amin trong đó 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 98% hoặc lớn hơn, vẫn tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn các gốc axit amin là giống nhau so với các gốc axit amin của trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 khi trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 và trình tự axit amin khác trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 được so sánh với nhau bằng cách sắp xếp thẳng hàng các trình tự này sao cho số lượng lớn nhất có thể của các gốc axit amin khớp nhau. Ở đây, trong cách sắp xếp các trình tự axit amin này, khoảng trống có thể được bao gồm để tạo ra độ đồng nhất lớn nhất.

Hơn nữa, trong khi “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” có thể là trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, “trình tự axit amin có độ đồng nhất” theo sáng chế cũng có thể bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn và trình tự axit amin có độ đồng nhất 85% hoặc lớn hơn. Đặc biệt, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” là được ưu tiên làm trình tự axit amin.

Ngoài ra, “trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn” có thể bao gồm “trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung”. Ví dụ được ưu tiên về trình tự axit amin như vậy là trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 làm tiêu chuẩn. Ví dụ được ưu tiên hơn là trình tự axit amin trong đó 1, 2, 3, 4, hoặc 5 axit amin bị khuyết, thay thế hoặc bổ sung.

Để làm enzym có trình tự axit amin như vậy, có thể đề cập đến EngK của họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*), ví dụ, như “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6”.

EngK được mã hóa bởi trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 5. Theo sáng chế, “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” có thể được xác định cũng bởi trình tự bazơ. Các ví dụ về trình tự bazơ mã hóa “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” của sáng chế cũng bao gồm trình tự bazơ có độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 85% hoặc lớn hơn, trình tự bazơ có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, và trình tự bazơ có độ đồng nhất 95% hoặc lớn hơn so với trình tự bazơ được bộc lộ trong SEQ ID NO: 5 miễn sao chúng là các trình tự bazơ mã hóa endoxenlulaza xử lý.

Trong “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế, “đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm” đề cập đến việc đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm sao cho enzym này có thể tác động để phân hủy sinh khối mềm.

Hiện tại, “sinh khối mềm” theo sáng chế đề cập đến sinh khối mềm như rom, bã mía, rom lúa mì, vỏ trấu, cỏ lau, cỏ chè vè, cỏ voi, cây lúa miến và thân cây ngô, chúng được tạo ra bằng cách tạo huyền phù cho chính sinh khối mềm hoặc sau khi cắt thành các kích thước thích hợp trong dung môi như nước hoặc dung dịch đậm (huyền phù chứa sinh khối mềm), hoặc các nguyên liệu tương tự.

Ngoài ra, “sinh khối mềm” theo sáng chế cũng bao gồm môi trường chứa rom làm cơ chất và môi trường chứa bã mía làm cơ chất được tạo ra theo cách tương tự như nêu trong các ví dụ của sáng chế với việc bổ sung các thành phần

như $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, NH_4Cl , KCl , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, L-xystein hydroclorua monohydrat, Trypton, sản phẩm chiết xuất từ nấm men, và dung dịch chứa lượng nhỏ kim loại, vào sinh khối mềm hoặc huyền phù chứa sinh khối mềm.

Phương pháp đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm chỉ cần là phương pháp đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm sao cho enzym này có thể tác động để phân hủy sinh khối mềm, và các phương pháp bất kỳ đã biết cho đến nay có thể được sử dụng.

Ví dụ, trong trường hợp nếu “sinh khối mềm” của sáng chế là chính sinh khối mềm này hoặc sinh khối mềm một cách đơn giản sau khi cắt chúng thành các kích thước thích hợp, có thể đưa ra đây: phương pháp ngâm sinh khối mềm trong enzym hoặc dung dịch chứa enzym này; phương pháp phun enzym hoặc dung dịch chứa enzym này vào sinh khối mềm bằng cách phun hoặc cách tương tự; phương pháp tưới enzym hoặc dung dịch chứa enzym này lên trên sinh khối mềm; và các phương pháp tương tự. Ngoài ra, bước xử lý áp suất như giảm áp hoặc tăng áp có thể được tiến hành nếu cần để cho phép enzym thâm vào sinh khối mềm, trong khi đó enzym được đưa đến tiếp xúc với sinh khối mềm hoặc sau khi enzym được đưa đến tiếp xúc với sinh khối mềm.

Trong trường hợp nếu “sinh khối mềm” theo sáng chế là môi trường chứa rom làm cơ chất, môi trường chứa bã mía làm cơ chất, hoặc các dạng tương tự, có thể đề cập đến: phương pháp bổ sung enzym hoặc dung dịch chứa enzym này vào môi trường này; phương pháp trộn môi trường này và enzym hoặc dung dịch chứa enzym này; và các phương pháp tương tự.

Cần lưu ý rằng phương pháp “đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm” bao gồm không chỉ các phương pháp đưa enzym hoặc dung dịch chứa enzym này mà còn các phương pháp đưa vi sinh vật sản xuất enzym hoặc nhóm các enzym tiếp xúc với sinh khối mềm bằng các phương pháp tương tự như được mô tả trên đây.

Các phương pháp “đưa enzym tiếp xúc với sinh khối mềm” này là giống nhau đối với enzym là “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, hoặc “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6”. Các phương pháp này là tương tự thậm chí khi các enzym đó được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm dưới dạng nhóm các enzym.

“Phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước đưa “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Trong bước này, các enzym chỉ cần đưa tiếp xúc với sinh khối mềm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy. Ví dụ, “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” có thể được đưa tiếp xúc ở tỷ lệ 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, hoặc các tỷ lệ tương tự.

Các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm bằng các phương pháp được đưa ra trên đây. Việc đưa các enzym này tiếp xúc với sinh khối mềm có thể được tiến hành bằng cách đưa “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” tiếp xúc với sinh khối mềm, và sau đó, đưa

“endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm. Trong trường hợp này, các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm theo thứ tự ngược lại.

Theo cách khác, “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm trong một lần.

Theo cách khác, sinh khối mềm mà “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” được đưa vào để tiếp xúc và sinh khối mềm mà “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” đã được đưa vào để tiếp xúc có thể được điều chế riêng biệt và sau đó được trộn với nhau.

Các ví dụ về các phương pháp tiếp xúc này bao gồm phương pháp đưa mỗi vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và vi sinh vật sản xuất “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Ngoài ra, trường hợp đưa vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm cũng được bao gồm.

Trong “phương pháp phân hủy sinh khối” bao gồm bước đưa

“exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm, sinh khối mềm mà mỗi enzym hoặc nhóm các enzym được đưa tiếp xúc có thể là sinh khối mềm đã biết từ trước đến nay, nhưng đặc biệt tốt hơn là rom.

Ngoài ra, “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước đưa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm. Trong bước này, các enzym chỉ cần đưa tiếp xúc với sinh khối mềm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy.

Các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm bằng các phương pháp được đưa ra trên đây. Việc đưa các enzym này tiếp xúc với sinh khối mềm có thể được tiến hành bằng cách đưa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” tiếp xúc với sinh khối mềm, sau đó đưa “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” tiếp xúc với sinh khối mềm, và sau đó đưa “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm. Trong trường hợp này, các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm theo thứ tự bất kỳ.

Theo cách khác, “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất

90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm ở cùng một thời điểm.

Theo cách khác, sinh khối mềm mà “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” đã được đưa vào để tiếp xúc, sinh khối mềm mà “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” đã được đưa vào để tiếp xúc, và sinh khối mềm mà “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” đã được đưa vào để tiếp xúc có thể được điều chế riêng biệt, và sau đó được trộn với nhau.

Các ví dụ về các phương pháp tiếp xúc này bao gồm phương pháp đưa mỗi loại vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, vi sinh vật sản xuất “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, vi sinh vật sản xuất “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp tiếp xúc này cũng bao gồm trường hợp đưa mỗi loại vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, vi sinh

vật sản xuất “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6”, và vi sinh vật sản xuất “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” và “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Ngoài ra, các ví dụ về các phương pháp tiếp xúc này cũng bao gồm trường hợp đưa toàn bộ vi sinh vật sản xuất “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, và “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Trong “phương pháp phân hủy sinh khối” bao gồm bước đưa “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, và “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm, sinh khối mềm mà mỗi enzym hoặc nhóm các enzym được đưa đến để tiếp xúc có thể là sinh khối mềm bất kỳ đã biết từ trước đến nay, nhưng đặc biệt tốt hơn là bã mía.

Hơn nữa, “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước đưa “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90%

hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm.

Trong bước này, các enzym chỉ cần đưa tiếp xúc với sinh khối mềm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy. Ví dụ, “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” có thể được đưa tiếp xúc ở tỷ lệ 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, hoặc các tỷ lệ tương tự.

Các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm bằng các phương pháp được đưa ra trên đây. Việc đưa các enzym này tiếp xúc với sinh khối mềm có thể được tiến hành bằng cách đưa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” tiếp xúc với sinh khối mềm, và sau đó đưa “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm. Trong trường hợp này, các enzym này có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm theo thứ tự ngược lại.

Theo cách khác, “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” có thể được đưa tiếp xúc với sinh khối mềm trong một lần.

Theo cách khác, sinh khối mềm mà “exoxenlulaza có trình tự axit amin

có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” đã được đưa vào để tiếp xúc và sinh khối mềm mà “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” đã được đưa vào để tiếp xúc có thể được điều chế riêng biệt và sau đó được trộn với nhau.

Trong các phương pháp tiếp xúc này, trường hợp đưa mỗi vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và vi sinh vật sản xuất “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm là được bao gồm.

Ngoài ra, trường hợp đưa vi sinh vật sản xuất “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm là cũng được bao gồm.

Trong “phương pháp phân hủy sinh khối” bao gồm bước đưa “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” và “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” tiếp xúc với sinh khối mềm, sinh khối mềm mà mỗi enzym hoặc nhóm các enzym được đưa đến để tiếp xúc có thể là sinh khối mềm bất kỳ đã biết từ trước đến nay như rơm và bã mía.

Trong phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo sáng chế bao gồm bước đưa vi sinh vật sản xuất enzym bất kỳ trong số các enzym nêu trong mục 1) đến 3) dưới đây tiếp xúc với sinh khối mềm, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật bất kỳ đã biết miễn sao vi sinh vật này tạo ra enzym bất kỳ trong số các enzym từ

1) đến 3), nhưng tốt hơn là vi sinh vật có khả năng tạo ra xenlulosom. *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*), mà là vi sinh vật có khả năng tạo ra xenlulosom, là đặc biệt được ưu tiên.

Cần lưu ý rằng, trong các enzym từ 1) đến 3) dưới đây, “exoxenlulaza” đề cập đến “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, “endoxenlulaza” đề cập đến “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, và “endoxenlulaza xử lý” đề cập đến “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6”.

1) exoxenlulaza

2) exoxenlulaza và endoxenlulaza

3) exoxenlulaza, endoxenlulaza, và endoxenlulaza xử lý

“Phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm” theo sáng chế chỉ cần bao gồm bước phân hủy sinh khối mềm bằng “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế, và có thể còn bao gồm các bước khác. “Phương pháp sản xuất hợp chất đích từ sinh khối mềm” theo sáng chế tốt hơn là phương pháp có thể sản xuất trực tiếp chất đích bằng cách phân hủy sinh khối mềm và sau đó lên men đường hoặc các chất tương tự thu được từ quá trình phân hủy này.

“Hợp chất đích” theo sáng chế có thể là hợp chất bất kỳ hoặc các hợp chất tương tự với nó miễn sao nó thu được bằng “phương pháp phân hủy sinh khối” theo sáng chế. Các ví dụ về “hợp chất đích” theo sáng chế cũng có thể bao gồm etanol, axit axetic, axit butyric, axit lactic, axit formic, và hydro.

“Enzym hoặc nhóm các enzym để phân hủy sinh khối mềm” theo sáng chế đề cập đến enzym hoặc nhóm các enzym có khả năng phân hủy sinh khối mềm như rơm và bã mía, và các ví dụ về chúng bao gồm enzym hoặc nhóm các

enzym phân hủy xenluloza chứa trong sinh khối mềm thành glucoza hoặc các chất tương tự.

“Enzym hoặc nhóm các enzym” của sáng chế chỉ cần là enzym hoặc nhóm các enzym bao gồm một hoặc nhiều loại bất kỳ trong số các mục từ 1) đến 3) sau:

- 1) exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2;
- 2) endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4; và
- 3) endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6.

Trong số chúng, ví dụ, để làm “exoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2”, có thể đề cập đến ExgS của họ Glycosyl Hydrolaza 48 (GH48) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) và các enzym tương tự.

Hơn nữa, ví dụ, để làm “endoxenlulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4”, có thể đề cập đến EngE của họ Glycosyl Hydrolaza 5 (GH5) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) và hoặc các enzym tương tự.

Hơn nữa, ví dụ, để làm “endoxenlulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6”, có thể đề cập đến EngK của họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 thu được từ *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) và các enzym tương tự.

Trong số chúng, các ví dụ về “nhóm các enzym” phân hủy sinh khối

mềm bao gồm nhóm các enzym bao gồm ít nhất các enzym 1) và 2) được đề cập trên đây. Trong nhóm các enzym, mỗi một enzym của 1) và 2) chỉ cần được bao gồm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy sinh khối mềm. Ví dụ, “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” làm enzym 1) và “endoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4” làm enzym 2) có thể được bao gồm ở tỷ lệ 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, hoặc các tỷ lệ tương tự. Sinh khối mềm bị phân hủy bởi “nhóm các enzym” có thể là sinh khối mềm bất kỳ đã biết từ trước đến nay, nhưng đặc biệt tốt hơn là rom.

Hơn nữa, các ví dụ về “nhóm các enzym” phân hủy sinh khối mềm bao gồm nhóm các enzym bao gồm ít nhất các enzym từ 1) đến 3) được đề cập trên đây. Trong nhóm các enzym này, mỗi một enzym từ 1) đến 3) có thể được bao gồm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy sinh khối mềm. Sinh khối mềm bị phân hủy bởi “nhóm các enzym” này có thể là sinh khối mềm bất kỳ đã biết từ trước đến nay, nhưng đặc biệt tốt hơn là bã mía.

Ngoài ra, các ví dụ về “nhóm các enzym” phân hủy sinh khối mềm bao gồm nhóm các enzym bao gồm ở ít nhất các enzym 1) và 3) được đề cập trên đây. Trong nhóm các enzym, mỗi enzym 1) và 3) chỉ cần được bao gồm ở tỷ lệ tối ưu cho quá trình phân hủy sinh khối mềm. Ví dụ, “exoxenulaza có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2” làm enzym 1) và “endoxenulaza xử lý có trình tự axit amin có độ đồng nhất 90% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6” làm enzym 3) có thể được bao gồm ở tỷ lệ 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, hoặc các tỷ lệ tương tự. Sinh khối mềm

bị phân hủy bởi “nhóm các enzym” này có thể là sinh khối mềm bất kỳ đã biết từ trước đến nay như rơm và bã mía.

Cần lưu ý rằng “nhóm các enzym” đặc biệt mong muốn tạo ra xenlulosom ở thời điểm tác động làm phân hủy sinh khối mềm như rơm và bã mía.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây bằng các ví dụ của sáng chế, nhưng sáng chế không chỉ bị giới hạn ở các ví dụ và các phương án biến đổi khác nhau có thể được tạo ra mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Sản xuất hợp chất đích sử dụng sinh khối mềm làm nguyên liệu thô trong *C. cellulovorans*

1. Môi trường

1) Môi trường chứa rơm làm cơ chất

Môi trường chứa 0,5% (trọng lượng/thể tích) rơm làm cơ chất được tạo ra nhờ các bước (1) đến (4) dưới đây với việc tham khảo tài liệu phi sáng chế 2.

(1) 1g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1g NH_4Cl , 0,5g KCl , 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15g L-xystein hydroclorua monohydrat, 0,5g Trypton, 0,5g sản phẩm chiết xuất từ nấm men, 5g rơm, 20ml dung dịch chứa lượng nhỏ kim loại, và 0,001g resazurin được hòa tan trong nước cất để điều chỉnh thể tích đến 1 L.

(2) Sau bước (1), độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng NaOH 4M, và khí CO_2 được sục vào trong đó đến khi resazurin bị khử (màu của môi trường thay đổi từ đỏ sang vàng) trong khi được đun sôi.

(3) Sau bước (2), bình cầu được bịt kín và được thanh trùng trong nồi hấp.

(4) Sau bước (3), 0,05ml dung dịch hỗn hợp 10% (trọng lượng/thể tích) Na_2CO_3 và 1,5% (trọng lượng/thể tích) $Na_2S \cdot 9H_2O$ được bổ sung vào đó để điều chỉnh độ pH đến 7,2. Do đó, thu được môi trường chứa 0,5% (trọng lượng/thể tích) rơm

làm cơ chất.

2) Môi trường nuôi cấy sơ bộ

Trong phương pháp điều chế môi trường chứa rom làm cơ chất trong phần 1) được đề cập trên đây, các bước (1) đến (3) được tiến hành mà không có rom, và sau đó, xenlobioza được bổ sung sao cho nồng độ cuối là 0,3% (trọng lượng/thể tích). Do đó, môi trường nuôi cấy sơ bộ chứa xenlobioza được tạo ra.

2. Chuẩn bị mẫu

1) *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường nuôi cấy sơ bộ thu được trong phần 1. 2) được đề cập trên đây ở 37°C trong 1 ngày.

2) Một phần môi trường sau khi nuôi cấy trong phần 1) được đề cập trên đây được đưa vào môi trường chứa rom làm cơ chất thu được trong phần 1. 1) được đề cập trên đây, và sau đó, việc nuôi cấy trong điều kiện tĩnh được tiến hành ở 37°C trong 1 tháng.

3) Sau quy trình nuôi cấy trong phần 2) được đề cập trên đây, việc tách ly tâm (15.000×g, 15 phút, 4°C) được tiến hành để thu gom dịch nổi nuôi cấy, sau đó bằng cách lọc sử dụng dụng cụ lọc Millex-LH (0,45 µm). 1 µL dịch nổi được tách sắc ký.

Để làm cột sắc ký, RT (trademark)-Q-BOND (sản xuất bởi Restek Corporation) được sử dụng, và các nồng độ của etanol và butanol được đo ở nhiệt độ SPL là 250°C, nhiệt độ cột là 150°C, nhiệt độ FID là 250°C với dòng N₂ làm khí mang ở tốc độ tuyến tính bằng 30 cm/giây.

Kết quả là, trong *C. cellulovorans*, etanol được phát hiện ở nồng độ 90229 ppm trong môi trường chứa rom làm cơ chất, như được thể hiện trong FIG.1. Theo đó, kết quả này cho thấy rằng etanol có thể được tạo ra trực tiếp từ rom, mà là sinh khối thực, bằng cách phân hủy và lên men rom bởi *C. cellulovorans*.

Ví dụ 2

Xác định enzym hoặc nhóm các enzym tác động một cách thích hợp phù hợp với cơ chất

1. Môi trường

1) Môi trường chứa bã mía làm cơ chất

Môi trường chứa 0,5% (trọng lượng/thể tích) bã mía làm cơ chất được tạo ra bằng phương pháp điều chế tương tự như đối với môi trường chứa rơm làm cơ chất trong ví dụ 1 ngoại trừ rằng 5g bã mía được sử dụng làm cơ chất thay vì rơm.

2) Môi trường chứa rơm làm cơ chất

Môi trường chứa 0,5% (trọng lượng/thể tích) rơm làm cơ chất được tạo ra bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1.

3) Môi trường nuôi cấy sơ bộ

Môi trường nuôi cấy sơ bộ chứa 0,3% (trọng lượng/thể tích) xenlobioza được tạo ra bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1.

2. Chuẩn bị mẫu

1) *Clostridium cellulovorans* (*C. cellulovorans*) được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường nuôi cấy sơ bộ thu được trong phần 1. 3) được đề cập trên đây ở 37°C trong 1 ngày.

2) Một phần môi trường sau khi nuôi cấy trong phần 1) được đề cập trên đây được đưa vào trong môi trường chứa bã mía làm cơ chất thu được trong phần 1.

1) được đề cập trên đây hoặc môi trường chứa rơm làm cơ chất thu được trong phần 1. 2) được đề cập trên đây, và tiếp theo, việc nuôi cấy trong điều kiện tĩnh được tiến hành ở 37°C trong khoảng thời gian nhất định.

3) Sau quy trình nuôi cấy trong phần 2) được đề cập trên đây, việc tách ly tâm được tiến hành để thu gom dịch nổi nuôi cấy, và toàn bộ protein chứa trong dịch nổi nuôi cấy được kết tủa bằng phương pháp kết tủa amoni sulfat. Sau khi rửa,

protein kết tủa được hòa tan trong dung dịch đệm Tris-HCl (pH 7,5), và do đó, thu được dung dịch protein.

4) Dung dịch protein thu được trong phần 3) được đề cập trên đây được tính là phần dịch nổi. Hơn nữa, Avicel (trademark) PH-101 (sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) (dưới đây đôi khi được đề cập dưới dạng Avicel) được bổ sung làm xenluloza vào phần dịch nổi, hỗn hợp được ủ ở 4°C trong 1 giờ, và Avicel và dịch nổi được tách bằng cách kết tủa ly tâm. Dịch nổi được tính là phần không được hấp phụ trên xenluloza (dưới đây đôi khi được đề cập dưới dạng phần không được hấp phụ). Tiếp theo, protein được hấp phụ trên Avicel được hòa tan trong dung dịch đệm SDS-Sample Buffer, mà được tính là phần được hấp phụ trên xenluloza (dưới đây đôi khi được đề cập dưới dạng phần được hấp phụ).

3. SDS-PAGE

Mỗi mẫu (phần dịch nổi, phần không được hấp phụ trên xenluloza, và phần được hấp phụ trên xenluloza) được tạo ra trong phần 2 được đề cập trên đây được tách bằng SDS-PAGE, và nhuộm màu bằng CBB được tiến hành. Quy trình SDS-PAGE và nhuộm màu bằng CBB được tiến hành bằng các phương pháp thông thường.

Các dải xuất hiện có màu sắc đặc biệt đậm trong SDS-PAGE được lựa chọn, và các dải xuất hiện có màu sắc đậm trong cả hai phần được hấp phụ của bã mía và rom (B1, B4, R1, và R2 trong FIG.2), dải mà xuất hiện có màu đậm đáng kể trong phần được hấp phụ của bã mía (B2 trong FIG.2), và hơn nữa, dải mà xuất hiện có màu đậm hầu hết chỉ xuất hiện trong phần được hấp phụ chứa bã mía (B3 trong FIG.2) mỗi dải này được cắt, và dung dịch làm mất màu CBB được loại bỏ bằng cách rửa bằng nước cất vô trùng.

4. Xác định protein

Trình tự axit amin của protein chứa trong mỗi dải được cắt ra trong phần 3. nêu trên được xác định bằng phổ khối - sắc ký lỏng hiệu năng cao (LTQ

Orbitrap Velos ETD sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific K.K.).

Trình tự axit amin xác định được so với trình tự hệ gen của *C. cellulovorans*, và protein chứa trong mỗi dải được xác định. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Cơ chất	Bã mía	Rom	SEQ ID NO	Protein
Mẫu	B1	R1	-	pyruvat feredoxin/flavodoxin oxidoreductaza
	B2	-	4	Họ Glycosyl Hydrolaza 5 (GH5)/ Endoxenlulaza (EngE)
	B3	-	6	Họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9)/ Endoxenlulaza xử lý (EngK)
	B4	R2	2	Họ Glycosyl Hydrolaza 48 (GH48)/ Exoxenlulaza (ExgS)

5. Kết quả phân tích

B1 và R1 là các dải ở cùng vị trí và đã được xác định là bao gồm pyruvat feredoxin/flavodoxin oxidoreductaza làm protein. Pyruvat feredoxin/flavodoxin oxidoreductaza là enzym chuyển hóa của vi khuẩn kỵ khí thông thường được sử dụng để sản xuất axit axetic và ATP từ axit pyruvic.

B2 đã được xác định là bao gồm, như một protein, EngE của họ Glycosyl Hydrolaza 5 (GH5) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự.

EngE là endoxenlulaza và việc phân tích hệ gen đã khẳng định được rằng EngE là Endoglucanaza sơ cấp có mặt bên ngoài cụm gen xenlulosom trong hệ gen của *C. cellulovorans*. Ngoài ra, thực tế rằng dải ở cùng vị trí đã được khẳng định cho mẫu này thu được từ môi trường chứa rom làm cơ chất trong FIG.2 đã gợi ý rằng EngE có khả năng là thành phần cấu trúc sơ cấp của xenlulosom.

Hơn nữa, B3 đã được xác định là bao gồm, như một protein, EngK của họ Glycosyl Hydrolaza 9 (GH9) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

EngK là endoxenlulaza xử lý và việc phân tích hệ gen đã khẳng định

được rằng EngK được bao gồm trong cụm gen xenulosom trong *C. cellulovorans* genome. Mặc dù EngK có CBM, họ của CBM này là khác so với họ của CBM của CbpA (Họ CbpA: CBM3, họ EngK: CBM4_9).

Hơn nữa, B4 và R2 là các dải ở cùng vị trí và được xác định là bao gồm, như một protein, ExgS của họ Glycosyl Hydrolaza 48 (GH48) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự.

ExgS là exoxenulaza và việc phân tích hệ gen đã khẳng định được rằng ExgS là enzym xenlusome chứa trong cụm gen xenulosom trong hệ gen của *C. cellulovorans*. Thực tế là ExgS không có modul liên kết xenluloza (CBM) chỉ ra rằng ExgS được phục hồi ở trạng thái trong đó CBM của CbpA được hấp phụ trên Avicel và vùng dockerin của ExgS được liên kết với vùng cohesin hấp phụ của CbpA.

Cần lưu ý rằng các enzym này được mã hóa theo trật tự từ ExgS, EngH, và sau đó là EngK trong cụm gen xenulosom trong sự phân tích hệ gen của *C. cellulovorans*, nhưng trong hệ này của sáng chế, EngH không phát hiện được.

Theo đó, các kết quả này cho thấy rằng exoxenulaza (ExgS) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 và endoxenulaza (EngE) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4 là quan trọng đối với quá trình phân hủy của rom.

Ngoài ra, các kết quả này cho thấy rằng exoxenulaza (ExgS) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2, endoxenulaza (EngE) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 4, và endoxenulaza xử lý (EngK) có trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6 là quan trọng đối với quá trình phân hủy của bã mía.

Ví dụ 3

Khẳng định -1 về tác dụng hiệp đồng của các enzym

1. Khẳng định sự biểu hiện của mỗi enzym trong số enzymes BglA, ExgS, và

EngK

BglA, ExgS, và EngK tái tổ hợp, mỗi loại này được biểu hiện trong *Escherichia coli* (*E. coli*) dùng làm vật chủ nhờ các bước từ 1) đến 5) dưới đây.

1) bglA (SEQ ID NO: 7), exgS (SEQ ID NO: 1), và engK (SEQ ID NO: 5) được xen vào sau yếu tố kích hoạt (Trigger factor), mà là đuôi hòa tan của pCold-TF (Takara Bio Inc.) dùng làm vector cho sự biểu hiện ở nhiệt độ thấp, và gen được chuyển vào *E. coli* origami dùng làm vật chủ để biểu hiện.

2) Đối với *E. coli* origami đã được chuyển gen trong phần 1) được đề cập trên đây, các khuẩn lạc mà các gen này lần lượt được chuyển được trải qua quá trình sàng lọc để sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc, và được ủ trong môi trường 5-ml LB (được bổ sung ampicilin (nồng độ cuối: 100 µg/ml)).

3) Các khuẩn lạc mà các gen tương ứng đã được chuyển thu được trong phần 2) được đề cập trên đây được nuôi cấy ở 37°C và 180 vòng/phút trong 6 giờ, và sau đó, 1ml dung dịch nuôi cấy được ủ trong môi trường 500-ml 2×YT (được bổ sung ampicilin (nồng độ cuối: 100 µg/ml)).

Khi nó đạt đến pha sinh trưởng lôgarit ($OD_{600}=0,45$ đến 0,5), việc nuôi cấy được tiến hành ở 15°C ở tốc độ 180 vòng/phút trong 30 phút, và sau đó, IPTG được bổ sung vào đó sao cho nồng độ cuối là 1,0 mM để gây ra sự biểu hiện protein, sau đó bằng cách ủ ở 15°C ở 180 vòng/phút trong 24 giờ.

4) Mỗi vi khuẩn trong đó có sự biểu hiện của protein thu được trong phần 3) được đề cập trên đây được thu gom bằng phương pháp kết tủa ly tâm (10.000×g, 4°C, 10 phút), và được tạo huyền phù trong 8ml dung dịch đệm 20 mM phosphat (pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol).

Huyền phù được trải qua quá trình siêu âm trong khoảng 300 giây trong khi được làm mát bằng đá sao cho nhiệt độ không tăng. Huyền phù này sau đó được trải qua quá trình kết tủa bằng phương pháp ly tâm (20.000×g, 4°C, 30 phút) và dịch nổi được dùng làm phần hòa tan. Kết tủa được tạo huyền phù trong

8ml dung dịch đệm phosphat giống nhau và kết tủa này được trải qua quá trình siêu âm và dùng làm phần không hòa tan.

5) Mỗi phần thu được trong phần 4) được đề cập trên đây được cho trải qua quá trình SDS-PAGE, và nhuộm màu bằng CBB và quá trình nhuộm màu miễn dịch được sử dụng để khẳng định liệu có mặt hay không có mặt protein đích.

Kết quả là, đã khẳng định được rằng mỗi protein (BglA, ExgS, hoặc EngK) được biểu hiện trong phần hòa tan và mức biểu hiện được tăng lên, như được thể hiện trong FIG.3A là kết quả của phương pháp nhuộm màu bằng CBB.

Ngoài ra, FIG.3B thể hiện kết quả thẩm tách miễn dịch (western blotting) mỗi protein (BglA, ExgS, hoặc EngK) bằng phương pháp thông thường sử dụng kháng thể kháng His. Kết quả là, đã khẳng định được rằng sự biểu hiện của mỗi protein (BglA, ExgS, hoặc EngK) bị hạn chế trong phần không hòa tan.

2. Đo hoạt tính enzym của ExgS và EngK

Đối với mỗi phần trong các phần hòa tan thu được trong phần 1. được đề cập trên đây, hoạt tính enzym định lượng được đánh giá bằng phương pháp 1) hoặc 2) dưới đây.

1) Hoạt tính của β -Glucosidaza được đánh giá bằng cách bổ sung 10 μ l phần hòa tan của mỗi protein (BglA, ExgS, hoặc EngK) vào 1ml dung dịch 10 mM p-nitrophenyl- β -glucosit, ủ hỗn hợp ở 37°C trong 5 phút, và sau đó quan sát sự thay đổi màu sắc của dung dịch.

2) Hoạt tính của xenlulaza được đánh giá như được mô tả dưới đây.

5% (trọng lượng/thể tích) Avicel trương nở trong axit phosphoric (xenluloza trương nở trong axit: ASC) được bổ sung vào 490 μ l dung dịch đệm phosphat 20mM (pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol) được tạo huyền phù trong ống dung tích 1,5ml, và các dung dịch enzym được bổ sung vào đó như được thể hiện trong Bảng 2.

Sau đó, việc nuôi cấy được tiến hành ở 37°C ở 180 vòng/phút trong 18

giờ, và tiếp theo, lượng đường khử tự do được đo bằng phương pháp DNS.

Bảng 2

Nhãn ống	(các) Thành phần	
b	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>bglA</i>	10 µl
S	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>exgS</i>	10 µl
K	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>engK</i>	10 µl
S	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>exgS</i>	5 µl
K	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>engK</i>	5 µl
S+K	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>exgS</i>	5 µl
	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami) chứa gen <i>engK</i>	5 µl
N1	20ml dung dịch đệm phosphat (pH 7,4)	10 µl
N2	Phần hòa tan <i>E. coli</i> (origami)	10 µl

FIG.4 thể hiện các kết quả hoạt tính enzym định lượng cho p-nitrophenyl- β -glucosit. Kết quả là, chỉ giản đồ thực nghiệm b (mẫu thu được bằng cách bổ sung phần hòa tan thu được từ *E. coli* (thể biến nạp) mà gen *bglA* được chuyển) được tạo màu vàng như được thể hiện trong FIG.4, và hoạt tính của β -Glucosidaza được quan sát thấy chỉ ở thể biến nạp này.

Ngoài ra, FIG.5 thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính ASC. Kết quả là, ExgS (họ GH 48) riêng lẻ hầu như không biểu hiện hoạt tính của xenlulaza như được thể hiện trong FIG.5. Ngược lại, EngK (họ GH 9) riêng lẻ biểu hiện hoạt tính xenlulaza rất thấp. Hơn nữa, ExgS và EngK hỗn hợp tạo ra tác dụng hiệp đồng đối với sự phân hủy của ASC, và hoạt tính xenlulaza mạnh do sự gia tăng đáng kể lượng đường khử đã được phát hiện.

Theo đó, với những kết quả này, đã khẳng định được rằng ExgS và EngK tái tổ hợp không thể hiện hoạt tính của β -Glucosidaza, nhưng lại thể hiện hoạt tính xenlulaza mạnh bằng cách kết hợp ExgS và EngK.

Ví dụ 4

Khẳng định-2 về tác dụng hiệp đồng của các enzym

1. Khẳng định sự biểu hiện của mỗi enzym ExgS, EngE, và EngK

ExgS, EngE, và EngK tái tổ hợp, mỗi loại này được biểu hiện trong *E. coli* dùng làm vật chủ nhờ các bước từ 1) đến 5) dưới đây.

1) *exgS* (SEQ ID NO: 1), *engE* (SEQ ID NO: 3), và *engK* (SEQ ID NO: 5) mỗi loại

được xen vào pCold-I (Takara Bio Inc.) dùng làm vector cho sự biểu hiện ở nhiệt độ thấp, và gen được chuyển vào *E. coli* origami dùng làm vật chủ để biểu hiện.

2) Đối với *E. coli* origami đã được chuyển gen thu được trong phần 1) được đề cập trên đây, các khuẩn lạc mà các gen tương ứng đã được chuyển được trải qua quá trình sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc, và được ủ trong 5ml môi trường LB (được bổ sung ampicilin (nồng độ cuối: 100 µg/ml)).

3) Sau khi các khuẩn lạc mà các gen tương ứng đã được chuyển thu được trong phần 2) được đề cập trên đây được nuôi cấy ở 37°C trong 10 giờ, 1ml dung dịch nuôi cấy được ủ trong 500-ml môi trường 2×YT (được bổ sung ampicilin (nồng độ cuối: 100 µg/ml)) và được nuôi cấy bằng cách lắc 140 vòng/phút đến khi nó đạt đến pha sinh trưởng lôgarit ($OD_{600}=0,5$). Sau đó, nhiệt độ được làm mát nhanh chóng xuống 4°C và duy trì trong 30 phút, và sau đó, IPTG được bổ sung vào đó sao cho nồng độ cuối là 0,5 mM để gây ra sự biểu hiện protein, sau đó bằng cách ủ ở 15°C ở 140 vòng/phút trong 24 giờ.

4) Mỗi loại vi khuẩn trong đó sự biểu hiện của protein được tạo ra thu được trong phần 3) được đề cập trên đây được thu gom bằng phương pháp kết tủa ly tâm ($8.000\times g$, 4°C, 10 phút), và được tạo huyền phù trong 5ml dung dịch đệm kali phosphat 50 mM (pH 6,3).

Huyền phù được trải qua quá trình siêu âm trong khoảng 300 giây trong khi được làm mát bằng đá sao cho nhiệt độ không tăng. Sau khi huyền phù được kết tủa ly tâm ($1.000\times g$, 3 phút) và các đoạn tế bào và các chất tương tự được loại bỏ, quá trình kết tủa ly tâm ở $15.000\times g$ được tiến hành trong 60 phút để thu gom phần không hòa tan. Dung dịch đệm Tris/HCl 0,1 mM (pH 7,4, 8M ure) được bổ sung vào giọt của phần không hòa tan và kết tủa được tạo huyền phù bằng phương pháp siêu âm, và sau đó, quá trình ủ được tiến hành ở 4°C trong 24 giờ để biến tính và hòa tan.

5) Mỗi phần thu được trong phần 4) được đề cập trên đây được trải qua quá trình

SDS-PAGE, và nhuộm màu bằng CBB được sử dụng để khẳng định liệu có mặt hay không protein đích. Kết quả là, đã khẳng định được rằng mỗi protein(ExgS, EngE, hoặc EngK) được biểu hiện chủ yếu trong phần không hòa tan.

2. Kết tủa enzym

Đối với mỗi enzym, các protein mà không hòa tan trong 8M ure (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) trong phần 1. được đề cập trên đây được loại bỏ bằng kết tủa ly tâm (15.000×g, 60 phút), và quá trình thẩm tách được tiến hành ở 4°C trong 24 giờ sử dụng màng xenluloza tái sinh được. Trong quy trình thẩm tách này, dung dịch đệm tái gấp nếp (20 mM Tris/HCl, pH 7,0, 1,5 mM xenlobioza (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) được thay đổi bốn lần.

Protein không hòa tan được loại bỏ bằng kết tủa ly tâm (15.000×g, 60 min) và dung dịch 10% streptomycin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (0,15 ml/ml) được bổ sung vào đó. Việc nuôi cấy được tiến hành ở 4°C trong 1 giờ, và sau đó, kết tủa được loại bỏ bằng cách kết tủa ly tâm (15.000×g, 60 min).

Sau đó, dịch nổi được trải qua quá trình SDS-PAGE, và nhuộm màu bằng CBB và quá trình nhuộm màu miễn dịch được sử dụng để khẳng định liệu có hay không protein đích. Kết quả là, đã khẳng định được rằng thu được các protein tinh khiết của các enzym (ExgS, EngE, hoặc EngK).

3. Đo hoạt tính enzym của ExgS, EngE, và EngK

Các enzym thu được trong phần 2 được đề cập trên đây được trộn với theo cách tỷ lệ khác nhau, và sự có mặt hoặc không có mặt của tác dụng hiệp đồng của hoạt tính enzym đối với xenluloza trương nở trong axit phosphoric (xenluloza trương nở trong axit: ASC) được điều chế từ xenluloza dạng tinh thể Avicel (Merck Ltd.) được đánh giá.

Cụ thể, dung dịch đệm chứa 2,5 µl 1M CaCl₂, 175 µl 20 mM axetat (pH 6,3, 2,5 mM CaCl₂), và 62,5 µl ASC (lượng xenluloza: 2%; nồng độ xenluloza cuối cùng: 0,5%) được nạp vào ống dung tích 1,5ml và được ủ ở 37°C trong 20

phút.

Đối với dung dịch này, 10 μ l (nồng độ cuối: 1,6 mM) của mỗi dung dịch trong các dung dịch enzym điều chế được bằng cách trộn các enzym tinh chế được trong phần 2 được đề cập trên đây kết hợp ở tỷ lệ 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, hoặc 0:100 được bổ sung, và hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 17 giờ trong khi lắc ở 140 vòng/phút. Những tỷ lệ này là những tỷ lệ được điều chỉnh sao cho nồng độ cuối của các enzym là 1,6 mM miễn sao trọng lượng phân tử (MW) của ExgS là 80,4 kDa, trọng lượng phân tử (MW) của EngE là 31,5 kDa, và trọng lượng phân tử (MW) của EngK là 97,1 kDa. Sau khi phản ứng trong 17 giờ, phản ứng enzym được ngừng bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 5 phút, và sau đó, lượng đường khử chứa trong dung dịch được đo bằng phương pháp DNS về xenlobioza.

Kết quả là, trong trường hợp kết hợp ExgS và EngE, sự kết hợp của EngE và ExgS ở tỷ lệ 75:25 đã biểu hiện tác dụng hiệp đồng cao nhất (S25E75 trong FIG.6A) như được thể hiện trong FIG.6A. Tuy nhiên, trong các trường hợp kết hợp EngE và EngK, hầu như không có tác dụng hiệp đồng thu được ở tỷ lệ bất kỳ như được thể hiện trong FIG.6B. Ngoài ra, như được thể hiện trong FIG.6C, trong các trường hợp kết hợp ExgS và EngK, sự kết hợp của EngK và ExgS ở tỷ lệ 75:25 đã thể hiện tác dụng hiệp đồng cao nhất (K75S25 trong FIG.6C).

Theo đó, bằng các kết quả này, đã khẳng định được rằng hoạt tính enzym gia tăng theo cách hiệp đồng bằng cách kết hợp ExgS và EngE hoặc ExgS và EngK ở tỷ lệ thích hợp.

Ví dụ 5

Khẳng định-3 về tác dụng hiệp đồng của các enzym

Xenlobioza là đã biết dùng làm chất ức chế hoạt tính enzym đối với exoxenlulaza (xenlobiohydrolaza). Các nghiên cứu trên CelS thu được từ *C. thermocellum* đã được thực hiện và đã được thông báo rằng hoạt tính enzym của

nó bị giảm xuống 1/10 hoặc thấp hơn nồng độ xenlobioza bằng 5%. Do đó, sự ảnh hưởng của tác dụng hiệp đồng của hoạt tính enzym của ExgS, EngE, và EngK đã được đánh giá với sự có mặt của xenlobioza dùng làm chất ức chế hoạt tính.

Cụ thể, 2,5 μ l dung dịch 1M CaCl_2 , 18,25 μ l dung dịch đệm 40 mM Tris/HCl (pH 7,0, 2,5 mM CaCl_2 , 0% hoặc 0,5% xenlobioza (FIG.7: 0 mg/ml hoặc 5,0 mg/ml)), và 62,5 μ l ASC (xenluloza content: 2%; nồng độ xenluloza cuối cùng: 0,5%) được nạp vào ống có dung tích 1,5-ml và hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 20 phút.

Sau đó, 10 μ l (nồng độ cuối: 1,6 mM) của mỗi dung dịch enzym hỗn hợp điều chế được bằng cách trộn ExgS, EngE, và EngK tinh chế được bằng phương pháp tương tự trong phần 2 được đề cập trên đây. trong ví dụ 4 kết hợp ở tỷ lệ trộn 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, hoặc 0:100 được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 17 giờ. Những tỷ lệ này là những tỷ lệ được điều chỉnh sao cho nồng độ cuối của các enzym là 1,6 mM miễn sao trọng lượng phân tử (MW) của ExgS là 80,4 kDa, trọng lượng phân tử (MW) của EngE là 31,5 kDa, và trọng lượng phân tử (MW) của EngK là 97,1 kDa.

Sau khi phản ứng trong 17 giờ, phản ứng enzym được ngừng bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 5 phút, và sau đó, lượng đường khử chứa trong dung dịch được đo bằng phương pháp DNS đối với xenlobioza.

FIG.7 thể hiện các kết quả. Trong đoạn này, trục y thể hiện tỷ lệ giữa nồng độ xenlobioza trong dung dịch phản ứng và số mol enzym được bổ sung và trục x thể hiện enzym được bổ sung và tỷ lệ giữa các enzym được ký hiệu bằng chữ cái và các số. Chữ cái s, e, và k trong trục x tương ứng thể hiện ExgS, EngE, và EngK, và mỗi trị số cuối thể hiện tỷ lệ của enzym trong các enzym được bổ sung ở nồng độ 1,6 mM. Ví dụ, e75k25 có nghĩa là EngE với lượng 75% và EngK với lượng 25% được bổ sung ở nồng độ 1,6 mM.

Các đồ thị dạng cột là khác nhau về nồng độ xenlobioza ban đầu trong dung dịch phản ứng. Cột nét liền thể hiện trường hợp trong đó nồng độ xenlobioza ban đầu là 0mg/ml và cột ký hiệu chấm thể hiện trường hợp trong đó nồng độ xenlobioza ban đầu là 5 mg/ml.

Trong số các kết quả này, Bảng 3 thể hiện tỷ lệ hoạt tính của xenlobioza đối với các trường hợp bổ sung mỗi enzym riêng lẻ và trường hợp có tỷ lệ enzym với sự ức chế đặc biệt thấp bởi xenlobioza (EngK:ExgS=75:25 hoặc 50:50). Kết quả là, đã khẳng định được rằng, trong các trường hợp bổ sung mỗi enzym riêng lẻ, hoạt tính giảm đến 19%, 8%, và 10% lần lượt cho ExgS, EngE, và EngK và các trường hợp này chịu sự ức chế hoạt tính có thể so sánh được với CelS được mô tả trên đây. Tuy nhiên, trong các trường hợp có tỷ lệ trộn của ExgS và EngK của 25:75 (k75s25 trong FIG.7) và 50:50 (k50s50 trong FIG.7), đã khẳng định được rằng sự ức chế hoạt tính trở nên vừa phải và hoạt tính enzym mạnh tương ứng là 44% và 41% được duy trì.

Bảng 3

Enzym	Tỷ lệ trộn (%)	Hoạt tính (%)
EngE	100	8
EngK	100	10
ExgS	100	19
ExgS+EngK	25+75	44
ExgK+ExgS	50+50	41

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo sáng chế có thể được sử dụng rộng rãi làm phương pháp phân hủy sinh khối mềm sử dụng phương pháp đơn giản mà không cần xử lý sơ bộ. Hơn nữa, bằng cách kết hợp phương pháp phân hủy sinh khối mềm theo sáng chế dưới dạng bước, dễ dàng tạo ra chất hữu ích như etanol từ sinh khối mềm này. Ngoài ra, có thể đề xuất enzym hoặc nhóm các enzym có khả năng tác động một cách hữu ích, phù hợp với loại sinh khối mềm.

Danh mục số chỉ dẫn

[FIG.2]

M: Gen đánh dấu protein

1: Phần dịch nổi của dịch nổi nuôi cấy chứa *C. cellulovorans* (cơ chất: bã mía)

2: Phần dịch nổi của dịch nổi nuôi cấy chứa *C. cellulovorans* (cơ chất: rơm)

3: Phần không được hấp phụ (cơ chất: bã mía)

4: Phần không được hấp phụ (cơ chất: rơm)

5: Phần được hấp phụ (cơ chất: bã mía)

6: Phần được hấp phụ (cơ chất: rơm)

B1, B2, B3, B4, R1, R2: phần dài được cắt

[FIG.3]

M: Các tiêu chuẩn SDS-PAGE

b: gen bglA chứa thể biến nạp

S: gen exgS chứa thể biến nạp

K: gen engK chứa thể biến nạp

[FIG.4]

b: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen bglA

S: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen exgS

K: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen engK

N1: 20-ml dung dịch phosphat (pH 7,4)

N2: phần hòa tan *E. coli* (origami)

[FIG.5]

ExgS: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen exgS

EngK: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen engK

ExgS+EngK: phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen exgS + phần hòa tan *E. coli* (origami) chứa gen engK

Đôi chứng âm: 20-ml dung dịch đệm phosphat (pH 7,4)

[FIG.6]

- A. S100: 100% ExgS, S75E25: 75% ExgS và 25% EngE, S25E75: 25% ExgS và 75% EngE, E100: 100% EngE
- B. E100: 100% EngE, E75K25: 75% EngE và 25% EngK, E25K75: 25% EngE và 75% EngK, K100: 100% EngK
- C. K100: 100% EngK, K75S25: 75% EngK và 25% ExgS, K25S75: 25% EngK và 75% ExgS, S100: 100% ExgS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất etanol từ xenluloza trương nở trong axit, phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra sản phẩm phân hủy bằng cách cho xenluloza trương nở trong axit tiếp xúc với hỗn hợp enzym của exoxenlulaza chứa trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 2 và endoxenlulaza xử lý chứa trình tự axit amin được bộc lộ trong SEQ ID NO: 6, trong đó tỷ lệ của exoxenlulaza so với endoxenlulaza xử lý trong hỗn hợp enzym nằm trong khoảng từ 25:75 đến 50:50; và lên men sản phẩm phân hủy để thu được etanol.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước lên men sản phẩm phân hủy được thực hiện bằng cách sử dụng *C. cellulovorans* làm sinh vật lên men.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mie University
Sumitomo Corporation

<120> Phương pháp sản xuất etanol từ xenluloza

<130> SC-2-PCT

<150> PCT/JP2012/053744

<151> 2012-02-17

<160> 7

<170> PatentIn phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 2184

<212> ADN

<213> *Clostridium cellulovorans*

<400> 1

atgagaaaaa gattaaataa gatcgttgct gttgctttaa ctgcaacaac tatatcatca	60
gtagcagcta ctgttaatac agtcaagtt tcagctgcac cagtagtgcc aaataatgag	120
tatgttcaac actttaagga tatgtacgct aagatccata atgcaaaciaa tggataacttc	180
agtgatgaag gaataacctta tcacgcagtt gaaacattaa tggttgaagc accagactat	240
ggcatgaaa ctacaagtga agcttttcagt tactatatgt ggcttgaagc tatgaacgct	300
aagcttactg gagatttctc aggattcaaa aaagcttggg atgtaactga aaagtacata	360
attccaggtg agactgatca accaagcgca agtatgagca attatgatcc aaataagcca	420
gctacatatg cagctgaaca tccagatcca agcatgtacc catctcaatt acaatttggg	480
gctgctgtag gtaaggatcc attatacaat gaattaaaat ctacttatgg aactagccaa	540
gtatatggta tgcattgggt actagatgtt gataactggg atgggttttg tggtgcaaca	600
agcacaagcc cagtatacat caacactttc caaagaggtg ttcaagaatc ttgttgggaa	660
actgtgccac aaccatgtaa agacgaaatg aagtacgggtg gaagaaacgg tttcttagat	720
ctattcactg gtgattcaca atacgcaact caattttaat atactaacgc tccagacgca	780
gatgctcgtg cagttcaagc tacttactat gcacaattag ctgctaaaga atggggagta	840
gacatcagct catatgtagc aaaatctact aagatgggtg acttcttaag atattcattc	900
tttgataaat acttttagaaa agttggaaat tcaacacaag caggaactgg atatgattca	960
gctcaatacc tattaactg gtactatgct tggggtggtg gaatcagctc aaactggctc	1020
tggagaattg gatcaagcca taaccatttc ggataccaaa acccaatggc agcatggata	1080
ttatcaaata catctgactt taaaccaaag tcaccaaagc ctgctacaga ttggaataac	1140
agtttaaaga gacaaataga attctatcaa tggttacaat ctgctgaagg tggtatcgct	1200

```

ggaggagcta gtaactcaaa tggaggaagc tatcaagcat ggccagcagg tactgcaaca 1260
ttctacggaa tgggatatac tcctcaccca gtatacgaag atccaggtag taacgaatgg 1320
tttggtatgc aagcatgggc aatgcaacgt gtggctgaat actactacag ttcaaaagat 1380
ccagcagcta aatcattact tgataaatgg gctaaatggg cttgtgcaaa tgttcaattc 1440
gatgatgcag ctaagaaatt taagattcct gctaaattag tatggactgg acaaccagat 1500
acttggactg gatcatatac aggaaattca aatcttcatg tttaaagttga agcttatgga 1560
gaagatcttg gagtagcagg ttcactttct aatgcattat catattatgc aaaagctctt 1620
gaatctagca cagatgctgc agataaagta gcatataaca ctgcaaaaaga aacttctaga 1680
aagatacttg attacttatg ggcaagctac caagatgata agggatatagc agttactgaa 1740
acaagaaatg atttcaaacg tttcaatcaa tctgtatata ttccatcagg ttggacagga 1800
aaaatgccta atggagatgt aatccaaagt ggagctactt tcttaagcat acgttcaaaa 1860
tacaacaag atccatcatg gccaaaagtt gaagctgctt tagcaaattg tactggtggt 1920
gatatgacat accacagatt ctgggggtcaa agtgatatcg ctatagcatt tggaacatac 1980
ggtacattat tcacagaccc tactccagga ttaaaagggtg atgttaactc tgatgctaaa 2040
gtaaatgcta tagatttagc tatattaaag aaatacatct tagattcaac aactaaaatt 2100
aacactgcta attctgatat gaacggtgat ggaaaagtta atgcaatgga tttagcttta 2160
ttaaagaaag cacttcttgc ttaa 2184

```

```

<210> 2
<211> 727
<212> PRT
<213> Clostridium cellulovorans

```

```
<400> 2
```

```

Met Arg Lys Arg Leu Asn Lys Ile Val Ala Val Ala Leu Thr Ala Thr
1          5          10          15

```

```

Thr Ile Ser Ser Val Ala Ala Thr Val Asn Thr Ala Gln Val Ser Ala
20          25          30

```

```

Ala Pro Val Val Pro Asn Asn Glu Tyr Val Gln His Phe Lys Asp Met
35          40          45

```

```

Tyr Ala Lys Ile His Asn Ala Asn Asn Gly Tyr Phe Ser Asp Glu Gly
50          55          60

```

```

Ile Pro Tyr His Ala Val Glu Thr Leu Met Val Glu Ala Pro Asp Tyr
65          70          75          80

```

```

Gly His Glu Thr Thr Ser Glu Ala Phe Ser Tyr Tyr Met Trp Leu Glu
85          90          95

```

Ala Met Asn Ala Lys Leu Thr Gly Asp Phe Ser Gly Phe Lys Lys Ala
 100 105 110

Trp Asp Val Thr Glu Lys Tyr Ile Ile Pro Gly Glu Thr Asp Gln Pro
 115 120 125

Ser Ala Ser Met Ser Asn Tyr Asp Pro Asn Lys Pro Ala Thr Tyr Ala
 130 135 140

Ala Glu His Pro Asp Pro Ser Met Tyr Pro Ser Gln Leu Gln Phe Gly
 145 150 155 160

Ala Ala Val Gly Lys Asp Pro Leu Tyr Asn Glu Leu Lys Ser Thr Tyr
 165 170 175

Gly Thr Ser Gln Val Tyr Gly Met His Trp Leu Leu Asp Val Asp Asn
 180 185 190

Trp Tyr Gly Phe Gly Gly Ala Thr Ser Thr Ser Pro Val Tyr Ile Asn
 195 200 205

Thr Phe Gln Arg Gly Val Gln Glu Ser Cys Trp Glu Thr Val Pro Gln
 210 215 220

Pro Cys Lys Asp Glu Met Lys Tyr Gly Gly Arg Asn Gly Phe Leu Asp
 225 230 235 240

Leu Phe Thr Gly Asp Ser Gln Tyr Ala Thr Gln Phe Lys Tyr Thr Asn
 245 250 255

Ala Pro Asp Ala Asp Ala Arg Ala Val Gln Ala Thr Tyr Tyr Ala Gln
 260 265 270

Leu Ala Ala Lys Glu Trp Gly Val Asp Ile Ser Ser Tyr Val Ala Lys
 275 280 285

Ser Thr Lys Met Gly Asp Phe Leu Arg Tyr Ser Phe Phe Asp Lys Tyr
 290 295 300

Phe Arg Lys Val Gly Asn Ser Thr Gln Ala Gly Thr Gly Tyr Asp Ser
 305 310 315 320

Ala Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Tyr Tyr Ala Trp Gly Gly Gly Ile Ser
 325 330 335

Ser Asn Trp Ser Trp Arg Ile Gly Ser Ser His Asn His Phe Gly Tyr
 340 345 350

Gln Asn Pro Met Ala Ala Trp Ile Leu Ser Asn Thr Ser Asp Phe Lys
 355 360 365

Pro Lys Ser Pro Asn Ala Ala Thr Asp Trp Asn Asn Ser Leu Lys Arg
 370 375 380

Gln Ile Glu Phe Tyr Gln Trp Leu Gln Ser Ala Glu Gly Gly Ile Ala
 385 390 395 400

Gly Gly Ala Ser Asn Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Gln Ala Trp Pro Ala
 405 410 415

Gly Thr Arg Thr Phe Tyr Gly Met Gly Tyr Thr Pro His Pro Val Tyr
 420 425 430

Glu Asp Pro Gly Ser Asn Glu Trp Phe Gly Met Gln Ala Trp Ser Met
 435 440 445

Gln Arg Val Ala Glu Tyr Tyr Tyr Ser Ser Lys Asp Pro Ala Ala Lys
 450 455 460

Ser Leu Leu Asp Lys Trp Ala Lys Trp Ala Cys Ala Asn Val Gln Phe
 465 470 475 480

Asp Asp Ala Ala Lys Lys Phe Lys Ile Pro Ala Lys Leu Val Trp Thr
 485 490 495

Gly Gln Pro Asp Thr Trp Thr Gly Ser Tyr Thr Gly Asn Ser Asn Leu
 500 505 510

His Val Lys Val Glu Ala Tyr Gly Glu Asp Leu Gly Val Ala Gly Ser
 515 520 525

Leu Ser Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Ala Lys Ala Leu Glu Ser Ser Thr
 530 535 540

Asp Ala Ala Asp Lys Val Ala Tyr Asn Thr Ala Lys Glu Thr Ser Arg
 545 550 555 560

Lys Ile Leu Asp Tyr Leu Trp Ala Ser Tyr Gln Asp Asp Lys Gly Ile
 565 570 575

Ala Val Thr Glu Thr Arg Asn Asp Phe Lys Arg Phe Asn Gln Ser Val
 580 585 590

Tyr Ile Pro Ser Gly Trp Thr Gly Lys Met Pro Asn Gly Asp Val Ile
 595 600 605

Gln Ser Gly Ala Thr Phe Leu Ser Ile Arg Ser Lys Tyr Lys Gln Asp
610 615 620

Pro Ser Trp Pro Asn Val Glu Ala Ala Leu Ala Asn Gly Thr Gly Val
625 630 635 640

Asp Met Thr Tyr His Arg Phe Trp Gly Gln Ser Asp Ile Ala Ile Ala
645 650 655

Phe Gly Thr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Asp Pro Thr Pro Gly Leu Lys
660 665 670

Gly Asp Val Asn Ser Asp Ala Lys Val Asn Ala Ile Asp Leu Ala Ile
675 680 685

Leu Lys Lys Tyr Ile Leu Asp Ser Thr Thr Lys Ile Asn Thr Ala Asn
690 695 700

Ser Asp Met Asn Gly Asp Gly Lys Val Asn Ala Met Asp Leu Ala Leu
705 710 715 720

Leu Lys Lys Ala Leu Leu Ala
725

<210> 3
<211> 3093
<212> ADN
<213> *Clostridium cellulovorans*

<400> 3
atgaagaaga gaaacagaat actatcatTT ttgctagttt tagcaatggT attctcttgt 60
gttggttagca aaccgttggt aaaagtatct gccgcagaag ctaactacac aacaaaaggc 120
actacgacac agatatatct tagtgccttt gcacaaaata ctgatgactg ggcttggatg 180
agtatgggag atactgctag cttagtatat caagacgtaa caaatttcaa tgccatcgac 240
gctactagtg cctttgcaaa ggcaaatggT actgcaaact ttgggttaca ggttgttgat 300
ggaaatcttg ctgcaggaga aaaaagtaca ttaaaattcc atattggaac agttactatt 360
aaagcaactg gatataatga tgttgtggtt aatcttaaca aggattattc agaagcatat 420
gcagcagaaa aagtttcttg gggaatcaca ggaaacaata catcaatttt actaaatgat 480
tatttaccAA cagatgcagc agcgaaagca acgtatctac aaaagattac tagtgtaaaa 540
gcagatgtta cattatcaga atatcaattt gttaaaccag catcaactgg gtcaacttct 600
gaaagtgtat actcatcagg tgatgcaaca aagatttatg ctagtgcgtt tgcacaaaat 660
actgatgact gggcttggat gagcatggga gatactgctg ttttaacata tcaaactgct 720

acaaacgtaa atgctatcaa tgcaggtact gcatttgcaa gtgcaaatgg aactgcaaac	780
tttggatatcc aaattgttga cggaaacctg gctgctgcag aaaaaatgac ttggggactt	840
actggaaata acacacaaat tttattaaat agttatttac caacggatgc aactgcaaaa	900
gctgcatatc tacaaaaaat aacttctggt acagctgatg ttacagtaac agattatcaa	960
togattaaac cagcaacagc aactggggaa gttctttaca caacaccagg tgttgaaaca	1020
aagatttctg ctagtgcttt tgcacaaaac accgatgact gggcttggat gagcgtaggt	1080
gatgggtgta gtcttcaata tcaaactgat acaactttaa atgctattag tgctgctggt	1140
acattagcaa aagcaaatgc tacagcaaac tttggtataa atattgttga tggaaatctt	1200
gctgctggag atgcaaacac attaaagttc catgttggaa cagttacaat taaagcaaca	1260
ggttatgatg acctgtgat taacttaaat aaagattact cagaagcatt tgcagcagaa	1320
aaagcttctt ggggacttac aggaaacaca aaacaaatth tattaactc ttatttacca	1380
acagatgcaa cagcaaaagt aaactatctt caaaagggtta ctagtggtac agctgatgta	1440
aaagtaacag attatacgtt tattaatat gtaccaccag caccagaatt ccctgctgat	1500
tacactcacc caacagaaat gagaggtctt tctgctatgg atttagtaaa agacatgaag	1560
attgggttga acttaggaaa tactttagaa tcagttggcg gagaaaactgg ttggggtaat	1620
cctgtaacaa caaagaaaat gtttgataca ttaaaggcag ctggctttaa tacagttccg	1680
tattcagtaa gatgggatga aaactatatt gatgctaatt atactattga tccagcatat	1740
atggctcgtg ttgaaacagt tgtaaaactat gcacttgcta acgatatgta tgccattggt	1800
aatattcacc ataataaatt ccaaggtcaa tttgatgaag cacacaaagc tgccatcatt	1860
aacgaaggta ctattgtatg gactcaaatt gcaaaccact ttaaagatta tagtgataaa	1920
ttaatatttg atacaataaa tgaaccaaga catgaagaag actgggttgg tacttcagaa	1980
tactttaatg tcttaaatga atataacgca aaaatagttc ctgtaatacg tgcaactggc	2040
gaaaataatg ctaagagact tataatggtt cctacttatt gtgcttcttc agattatcct	2100
aaggttgctg gtatggtagt accaaatgat cctaattgtg cagtatctat ccacgcttac	2160
ataccatata atttagcact taatatagct ccaggtagac caactacctt tgggtgatgct	2220
gacgcagcat ttattgacaa gactttcaga atgttaaaca acacatttgt taaaaaggga	2280
attcctgtta ttatcgtgta attcgcgatt acagataaag ataacttaca agacagaatt	2340
aactttacga agttctatgt atcaacagct actgcttatg gaatgccatg tttgtggtgg	2400
gataataata attttggtag cacaggtagg agactggggc ttttaaataag aaaaaacctt	2460
acattccctt atcctgaatt agtacaagct atgaaagatg gtttcaacaa tccaagagat	2520
ctttcaaccg ttgatccaaa cgtattatth agtggtacag catcttgtag aggctggagc	2580
acagcactth cattatccta tggcttagat tttgtagata ctgaatttac aaatgattth	2640

```

acaatagctg tagattacac aagtgaaaat gtacctcaat tagtcctata tggaaaacttg 2700
actggtacag gttgggttat ggtaaaacct tcaacaatca aaacaagcgc aactacaaag 2760
actgcatact ttactataaa tgatatggta agtgcataata agaaagctct tgcaaactat 2820
gatagctatg gtaaggtatt accaggaatc caaggtatct tagttggaga tactgggtgca 2880
gaccttacag taacaaaagt ttacaagaat gcacaacctg taaatcttct aggcgatgta 2940
gacggtaatg atgtagtta ttcacttgat tttgagttat taaagaagta tgtattaaac 3000
aatgatacaa tgataaacia agctagtgc gatttaaata aggatggaaa aatcaacata 3060
attgatcttg cattcttaaa aaaagcaata taa 3093

```

```

<210> 4
<211> 1030
<212> PRT
<213> Clostridium cellulovorans

```

```

<400> 4

```

```

Met Lys Lys Arg Asn Arg Ile Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Ala Met
1 5 10 15

```

```

Val Phe Ser Cys Val Val Ser Lys Pro Leu Val Lys Val Ser Ala Ala
20 25 30

```

```

Glu Ala Asn Tyr Thr Thr Lys Gly Thr Thr Thr Gln Ile Tyr Leu Ser
35 40 45

```

```

Ala Phe Ala Gln Asn Thr Asp Asp Trp Ala Trp Met Ser Met Gly Asp
50 55 60

```

```

Thr Ala Ser Leu Val Tyr Gln Asp Val Thr Asn Phe Asn Ala Ile Asp
65 70 75 80

```

```

Ala Thr Ser Ala Phe Ala Lys Ala Asn Gly Thr Ala Asn Phe Gly Leu
85 90 95

```

```

Gln Val Val Asp Gly Asn Leu Ala Ala Gly Glu Lys Ser Thr Leu Lys
100 105 110

```

```

Phe His Ile Gly Thr Val Thr Ile Lys Ala Thr Gly Tyr Asn Asp Val
115 120 125

```

```

Val Val Asn Leu Asn Lys Asp Tyr Ser Glu Ala Tyr Ala Ala Glu Lys
130 135 140

```

```

Val Ser Trp Gly Ile Thr Gly Asn Asn Thr Ser Ile Leu Leu Asn Asp
145 150 155 160

```

```

Tyr Leu Pro Thr Asp Ala Ala Ala Lys Ala Thr Tyr Leu Gln Lys Ile

```

165							170							175						
Thr	Ser	Val	Lys 180	Ala	Asp	Val	Thr	Leu 185	Ser	Glu	Tyr	Gln	Phe 190	Val	Lys					
Pro	Ala	Ser 195	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser 200	Glu	Ser	Val	Tyr	Ser 205	Ser	Gly	Asp					
Ala	Thr 210	Lys	Ile	Tyr	Ala	Ser 215	Ala	Phe	Ala	Gln	Asn 220	Thr	Asp	Asp	Trp					
Ala 225	Trp	Met	Ser	Met	Gly 230	Asp	Thr	Ala	Val	Leu 235	Thr	Tyr	Gln	Thr	Ala 240					
Thr	Asn	Val	Asn	Ala 245	Ile	Asn	Ala	Gly	Thr 250	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala 255	Asn					
Gly	Thr	Ala	Asn 260	Phe	Gly	Ile	Gln	Ile 265	Val	Asp	Gly	Asn	Leu 270	Ala	Ala					
Ala	Glu	Lys 275	Met	Thr	Trp	Gly	Leu 280	Thr	Gly	Asn	Asn	Thr 285	Gln	Ile	Leu					
Leu	Asn 290	Ser	Tyr	Leu	Pro	Thr 295	Asp	Ala	Thr	Ala	Lys 300	Ala	Ala	Tyr	Leu					
Gln 305	Lys	Ile	Thr	Ser	Val 310	Thr	Ala	Asp	Val	Thr 315	Val	Thr	Asp	Tyr	Gln 320					
Ser	Ile	Lys	Pro	Ala 325	Thr	Ala	Thr	Gly	Glu 330	Val	Leu	Tyr	Thr	Thr 335	Pro					
Gly	Val	Glu	Thr 340	Lys	Ile	Ser	Ala	Ser 345	Ala	Phe	Ala	Gln	Asn 350	Thr	Asp					
Asp	Trp	Ala 355	Trp	Met	Ser	Val	Gly 360	Asp	Gly	Val	Ser	Leu 365	Gln	Tyr	Gln					
Thr	Asp 370	Thr	Thr	Leu	Asn	Ala 375	Ile	Ser	Ala	Ala	Gly 380	Thr	Leu	Ala	Lys					
Ala 385	Asn	Ala	Thr	Ala	Asn 390	Phe	Gly	Ile	Asn	Ile 395	Val	Asp	Gly	Asn	Leu 400					
Ala	Ala	Gly	Asp	Ala 405	Asn	Thr	Leu	Lys	Phe 410	His	Val	Gly	Thr	Val 415	Thr					
Ile	Lys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asp	Leu	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Lys	Asp					

420	425	430
Tyr Ser Glu Ala Phe Ala Ala Glu Lys Ala Ser Trp Gly Leu Thr Gly		
435	440	445
Asn Thr Lys Gln Ile Leu Leu Asn Ser Tyr Leu Pro Thr Asp Ala Thr		
450	455	460
Ala Lys Val Asn Tyr Leu Gln Lys Val Thr Ser Val Thr Ala Asp Val		
465	470	475
Lys Val Thr Asp Tyr Thr Phe Ile Lys Tyr Val Pro Pro Ala Pro Glu		
485	490	495
Phe Pro Ala Asp Tyr Thr His Pro Thr Glu Met Arg Gly Leu Ser Ala		
500	505	510
Met Asp Leu Val Lys Asp Met Lys Ile Gly Trp Asn Leu Gly Asn Thr		
515	520	525
Leu Glu Ser Val Gly Gly Glu Thr Gly Trp Gly Asn Pro Val Thr Thr		
530	535	540
Lys Lys Met Phe Asp Thr Leu Lys Ala Ala Gly Phe Asn Thr Val Pro		
545	550	555
Tyr Ser Val Arg Trp Asp Glu Asn Tyr Ile Asp Ala Asn Tyr Thr Ile		
565	570	575
Asp Pro Ala Tyr Met Ala Arg Val Glu Thr Val Val Asn Tyr Ala Leu		
580	585	590
Ala Asn Asp Met Tyr Ala Ile Val Asn Ile His His Asn Lys Phe Gln		
595	600	605
Gly Gln Phe Asp Glu Ala His Lys Ala Ala Ile Ile Asn Glu Gly Thr		
610	615	620
Ile Val Trp Thr Gln Ile Ala Asn His Phe Lys Asp Tyr Ser Asp Lys		
625	630	635
Leu Ile Phe Asp Thr Ile Asn Glu Pro Arg His Glu Glu Asp Trp Val		
645	650	655
Gly Thr Ser Glu Tyr Phe Asn Val Leu Asn Glu Tyr Asn Ala Lys Ile		
660	665	670
Val Pro Val Ile Arg Ala Thr Gly Glu Asn Asn Ala Lys Arg Leu Ile		

675	680	685
Met Val Pro Thr Tyr Cys Ala Ser Ser Asp Tyr Pro Lys Val Ala Gly		
690	695	700
Met Val Val Pro Asn Asp Pro Asn Val Ala Val Ser Ile His Ala Tyr		
705	710	715
Ile Pro Tyr Asn Leu Ala Leu Asn Ile Ala Pro Gly Thr Pro Thr Thr		
	725	730
Phe Gly Asp Ala Asp Ala Ala Phe Ile Asp Lys Thr Phe Arg Met Leu		
	740	745
Asn Asn Thr Phe Val Lys Lys Gly Ile Pro Val Ile Ile Gly Glu Phe		
	755	760
Ala Ile Thr Asp Lys Asp Asn Leu Gln Asp Arg Ile Asn Phe Thr Lys		
	770	775
Phe Tyr Val Ser Thr Ala Thr Ala Tyr Gly Met Pro Cys Leu Trp Trp		
785	790	795
Asp Asn Asn Asn Phe Gly Ser Thr Gly Glu Arg Leu Gly Leu Leu Asn		
	805	810
Arg Lys Asn Leu Thr Phe Pro Tyr Pro Glu Leu Val Gln Ala Met Lys		
	820	825
Asp Gly Phe Asn Asn Pro Arg Asp Leu Ser Thr Val Asp Pro Asn Val		
	835	840
Leu Phe Ser Gly Thr Ala Ser Cys Thr Gly Trp Ser Thr Ala Leu Ser		
	850	855
Leu Ser Tyr Gly Leu Asp Phe Val Asp Thr Glu Phe Thr Asn Asp Phe		
865	870	875
Thr Ile Ala Val Asp Tyr Thr Ser Glu Asn Val Pro Gln Leu Val Leu		
	885	890
Tyr Gly Asn Leu Thr Gly Thr Gly Trp Val Met Val Lys Pro Ser Thr		
	900	905
Ile Lys Thr Ser Ala Thr Thr Lys Thr Ala Tyr Phe Thr Ile Asn Asp		
	915	920
Met Val Ser Ala Tyr Lys Lys Ala Leu Ala Asn Tyr Asp Ser Tyr Gly		
	930	935
		940

Lys Val Leu Pro Gly Ile Gln Gly Ile Leu Val Gly Asp Thr Gly Ala
 945 950 955 960

Asp Leu Thr Val Thr Lys Val Tyr Lys Asn Ala Gln Pro Val Asn Leu
 965 970 975

Leu Gly Asp Val Asp Gly Asn Asp Val Val Asn Ser Leu Asp Phe Glu
 980 985 990

Leu Leu Lys Lys Tyr Val Leu Asn Asn Asp Thr Met Ile Asn Lys Ala
 995 1000 1005

Ser Ala Asp Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ile Asn Ile Ile Asp Leu
 1010 1015 1020

Ala Phe Leu Lys Lys Ala Ile
 1025 1030

<210> 5
 <211> 2679
 <212> ADN
 <213> *Clostridium cellulovorans*

<400> 5
 atgcgtagta aaaaattaat agcttgcgta acagcattag ctacagtact aagtgtttca 60
 acagttgcta cttcagttgc tactactaaa actgttagtg cagcaacaat ggtaagtgtt 120
 ggagaattaa tcagaaacaa taaatttgac aatgggtgttg ggttaccatg gacagttgtt 180
 gagtcttacc cagcaaaatc tagctttgaa atcaaagatg gaaaatacta tgtaacagtt 240
 cttcaagacg gtgtagaagg aagatgggat gttcaattcc gtcacagagg tcttgttata 300
 gaacaaggac ataaatacag agttaaat ttt actgtaactg ctgataaaga ttgttacgtt 360
 tatccaaaaa taggtgacca aggtgaacct tataaagaat attggaacta taactcatat 420
 caaagagtac aattaagagc tgggtgttcca acaacaattg atcaaacttt tgaaatgaga 480
 gatgcaacag ctagaacagc tgaatttgca attcaccttg ctggtgactg taaggcagca 540
 acattccctt atacatttac ttttgatgat atgtatgtat cagatccaca attcccagga 600
 tatgtagctg aaactccaga accaacaac gcaataagag ttaaccaagt aggttactta 660
 ccaggcgtag caaagaaagc tacagttgtt acaaaagcaa caactccaat aaactggtac 720
 ttaaagaata gttcaggtgt tcaagttgct actggcacia caacagttaa aggcttagat 780
 agcgcttcag gagataatgt acatattata gattttctcaa attacacaac tccaggaact 840
 ggctacacat tatcagttga ttcaacaac gttgattcaa caattaatga ttctgcttca 900
 agtatgcctt ttactatagg aacagattta tatttctaaaa tgaaacatga atcaataaaa 960

tacttctact taaacagaag tgctattcca ataacaatgc catatgctga acgtactgat 1020
ttaactcgtg cagcaggaca tacaacggat ttgatgccaa ctgatgcaag ttcaagtgat 1080
ccaagtcctt ggtataaaga aaattatagt ctagatgtta caggtggatg gtatgacgct 1140
ggagaccacg gtaagtacgt tgttaacggg ggtatctctg tttggacaat gatgaaccaa 1200
tatgaaagag ctaagaaatt aggacaagct aatgtagctc catttgcaga taatacaatg 1260
aatatcccag aaagcggaaa cggctatcca gatattcttg atgaatcacg tttccaaatg 1320
gatttaaatga tgaagatgca aattccagct ggtaaaactt acgctgggat ggctcaccat 1380
aaaggatcatg atgaaagatg gacagctctt gcaatccgtc cagaccaaga tccaatgaaa 1440
cgttacttaa aagcaccaag tacagctgca acattaaacc ttgctgctac agctgcacaa 1500
gcttcacgtt tatggaaagg tattgatgat gcatattctg ctaagtgttt agcgtctgct 1560
gaaactgcat ggaaagcagc taaggctaatt ccagcaatat atgcaccatt tgaaaatggg 1620
cctgggtggg gagcttacgg tgatgacaac gtaacagatg aattctactg ggcagcagca 1680
gaactttatg aaacaactgg aacatcagaa tatcttgact acatgaagaa taattcttca 1740
gataaattct taaagatgcc aactacatta actgggtggag aagacaaagg attatcaggt 1800
gctttcgact ggggtaatgt tgctgggtta ggaacaattt ctcttgctat tggtgataaa 1860
ttagatgcta catcaaaagc aactgtaaga gctaattgtg ctgccgctgc tgatgtattt 1920
gtagctaata caaatagtga aggttatggg actccaatgg ttcaaggacc agcatttgag 1980
gaaaaggatg caagtggaaa agttataaga acaataactg gctatccatg gggttcaaac 2040
tcattcgtag ctaaccaagc tatcgttatg ggttacgctt atgactttac aaaaggcgat 2100
gcagataaga aaaaatctaa ttcgactttt aatgggttaa caagtgctat ggactattta 2160
ttaggacgta acccaatggg acaatcatac gttactggat atggttctaa cccactagaa 2220
aatccacatc accgtttctg ggcataccaa gctgacaaca cattccctaa agctccagca 2280
ggatgtttat caggtgggtc taacacagga ttacaagatc catgggttaa aggctcaggt 2340
tggggaggtg gtactaagcc agctgctaaa tgcttcattg acaatataga atcatgggtc 2400
actaatgaaa tcacaatcaa ctggaatgca ccaattgcat ggatgtcttc atacatggat 2460
ttaaataagg atgcaaaaac aatagatatt actattccac ctactacatc aggtgatgta 2520
aacggagata ctaagataaa tgctatcgat ttagctatgt taaagaaata taccctagac 2580
aattcaactg taatcaaaac agctaacgct gatatgaata atgatggaaa aattaatgct 2640
atagatttag ctttattaaa gaagaaactt ctttcttaa 2679

<210> 6

<211> 892

<212> PRT

<213> *Clostridium cellulovorans*

<400> 6

Met Arg Ser Lys Lys Leu Ile Ala Cys Val Thr Ala Leu Ala Thr Val
 1 5 10 15

Leu Ser Val Ser Thr Val Ala Thr Ser Val Ala Thr Thr Lys Thr Val
 20 25 30

Ser Ala Ala Thr Met Val Ser Val Gly Glu Leu Ile Arg Asn Asn Lys
 35 40 45

Phe Asp Asn Gly Val Gly Leu Pro Trp Thr Val Val Glu Ser Tyr Pro
 50 55 60

Ala Lys Ser Ser Phe Glu Ile Lys Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Thr Val
 65 70 75 80

Leu Gln Asp Gly Val Glu Gly Arg Trp Asp Val Gln Phe Arg His Arg
 85 90 95

Gly Leu Val Ile Glu Gln Gly His Lys Tyr Arg Val Lys Phe Thr Val
 100 105 110

Thr Ala Asp Lys Asp Cys Tyr Val Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Gln Gly
 115 120 125

Glu Pro Tyr Lys Glu Tyr Trp Asn Tyr Asn Ser Tyr Gln Arg Val Gln
 130 135 140

Leu Arg Ala Gly Val Pro Thr Thr Ile Asp Gln Thr Phe Glu Met Arg
 145 150 155 160

Asp Ala Thr Ala Arg Thr Ala Glu Phe Ala Ile His Leu Ala Gly Asp
 165 170 175

Cys Lys Ala Ala Thr Phe Pro Tyr Thr Phe Thr Phe Asp Asp Met Tyr
 180 185 190

Val Ser Asp Pro Gln Phe Pro Gly Tyr Val Ala Glu Thr Pro Glu Pro
 195 200 205

Thr Asn Ala Ile Arg Val Asn Gln Val Gly Tyr Leu Pro Gly Val Ala
 210 215 220

Lys Lys Ala Thr Val Val Thr Lys Ala Thr Thr Pro Ile Asn Trp Tyr
 225 230 235 240

Leu Lys Asn Ser Ser Gly Val Gln Val Ala Thr Gly Thr Thr Thr Val
 245 250 255

Lys Gly Leu Asp Ser Ala Ser Gly Asp Asn Val His Ile Ile Asp Phe
 260 265 270

Ser Asn Tyr Thr Thr Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Leu Ser Val Asp Ser
 275 280 285

Thr Asn Val Asp Ser Thr Ile Asn Asp Ser Ala Ser Ser Met Pro Phe
 290 295 300

Thr Ile Gly Thr Asp Leu Tyr Ser Lys Met Lys His Glu Ser Ile Lys
 305 310 315 320

Tyr Phe Tyr Leu Asn Arg Ser Ala Ile Pro Ile Thr Met Pro Tyr Ala
 325 330 335

Glu Arg Thr Asp Leu Thr Arg Ala Ala Gly His Thr Thr Asp Leu Met
 340 345 350

Pro Thr Asp Ala Ser Ser Ser Asp Pro Ser Pro Trp Tyr Lys Glu Asn
 355 360 365

Tyr Ser Leu Asp Val Thr Gly Gly Trp Tyr Asp Ala Gly Asp His Gly
 370 375 380

Lys Tyr Val Val Asn Gly Gly Ile Ser Val Trp Thr Met Met Asn Gln
 385 390 395 400

Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Leu Gly Gln Ala Asn Val Ala Pro Phe Ala
 405 410 415

Asp Asn Thr Met Asn Ile Pro Glu Ser Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Ile
 420 425 430

Leu Asp Glu Ser Arg Phe Gln Met Asp Leu Met Met Lys Met Gln Ile
 435 440 445

Pro Ala Gly Lys Thr Tyr Ala Gly Met Ala His His Lys Gly His Asp
 450 455 460

Glu Arg Trp Thr Ala Leu Ala Ile Arg Pro Asp Gln Asp Pro Met Lys
 465 470 475 480

Arg Tyr Leu Lys Ala Pro Ser Thr Ala Ala Thr Leu Asn Leu Ala Ala
 485 490 495

Thr Ala Ala Gln Ala Ser Arg Leu Trp Lys Gly Ile Gly Asp Ala Tyr
 500 505 510

Ser Ala Lys Cys Leu Ala Ser Ala Glu Thr Ala Trp Lys Ala Ala Lys
515 520 525

Ala Ser Pro Ala Ile Tyr Ala Pro Phe Glu Asn Gly Pro Gly Gly Gly
530 535 540

Ala Tyr Gly Asp Asp Asn Val Thr Asp Glu Phe Tyr Trp Ala Ala Ala
545 550 555 560

Glu Leu Tyr Glu Thr Thr Gly Thr Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Met Lys
565 570 575

Asn Asn Ser Ser Asp Lys Phe Leu Lys Met Pro Thr Thr Leu Thr Gly
580 585 590

Gly Glu Asp Lys Gly Leu Ser Gly Ala Phe Asp Trp Gly Asn Val Ala
595 600 605

Gly Leu Gly Thr Ile Ser Leu Ala Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ala Thr
610 615 620

Ser Lys Ala Thr Val Arg Ala Asn Val Ala Ala Ala Asp Val Phe
625 630 635 640

Val Ala Asn Thr Asn Ser Glu Gly Tyr Gly Thr Pro Met Val Gln Gly
645 650 655

Pro Ala Phe Glu Glu Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Arg Thr Ile
660 665 670

Thr Gly Tyr Pro Trp Gly Ser Asn Ser Phe Val Ala Asn Gln Ala Ile
675 680 685

Val Met Gly Tyr Ala Tyr Asp Phe Thr Lys Gly Asp Ala Asp Lys Lys
690 695 700

Lys Ser Asn Ser Tyr Phe Asn Gly Leu Thr Ser Ala Met Asp Tyr Leu
705 710 715 720

Leu Gly Arg Asn Pro Met Val Gln Ser Tyr Val Thr Gly Tyr Gly Ser
725 730 735

Asn Pro Leu Glu Asn Pro His His Arg Phe Trp Ala Tyr Gln Ala Asp
740 745 750

Asn Thr Phe Pro Lys Ala Pro Ala Gly Cys Leu Ser Gly Gly Pro Asn
755 760 765

Thr Gly Leu Gln Asp Pro Trp Val Lys Gly Ser Gly Trp Gly Val Gly
770 775 780

Thr Lys Pro Ala Ala Lys Cys Phe Met Asp Asn Ile Glu Ser Trp Ser
785 790 795 800

Thr Asn Glu Ile Thr Ile Asn Trp Asn Ala Pro Ile Ala Trp Met Ser
805 810 815

Ser Tyr Met Asp Leu Asn Lys Asp Ala Lys Thr Ile Asp Ile Thr Ile
820 825 830

Pro Pro Thr Thr Ser Gly Asp Val Asn Gly Asp Thr Lys Ile Asn Ala
835 840 845

Ile Asp Leu Ala Met Leu Lys Lys Tyr Ile Leu Asp Asn Ser Thr Val
850 855 860

Ile Lys Thr Ala Asn Ala Asp Met Asn Asn Asp Gly Lys Ile Asn Ala
865 870 875 880

Ile Asp Leu Ala Leu Leu Lys Lys Lys Leu Leu Ser
885 890

<210> 7

<211> 1338

<212> ADN

<213> *Clostridium cellulovorans*

<400> 7

```

atggaaaagc taagatttcc caaagatttt atttttggaa cagccactgc agcatatcaa      60
attgaaggag cttacaaaga agatgagaaa ggtgaatcta tttgggatag gtttagtcat      120
ataccaggaa atgtagctaa aatgcataat ggtgatattg cttgtgatca ctatcataga      180
tataaagaag atgttcagct attaaaaagc cttggaatta aaagttatag gttttcaatt      240
gcttggccta gaattttccc aaaaggtttt ggcgagataa accagaaggg aattcagttc      300
tatagggatt taattgatga actaattaaa aatgatatag aaccagctat aacaatttat      360
cattgggatc ttccacaaaa gcttcaggat attggagggt gggcaaatcc gcaagttgct      420
gattactatg ttgattatgc aaacttatta ttcagagagt tcggagatag agtaaaaaca      480
tgataactc ataatgagcc atgggttgca tcatatcttg gctatgcttt aggagttcat      540
gctccaggaa ttaaagatat gaaaatggca ttgtagctg cacataacat attattatcg      600
cactttaagg cagttaaagc ttatagagaa ttagaacaag atgggcaa at aggtataaca      660
ttaaactctt caacctgtta ttcaaattca gctgatgaag aagatattgc tgcagcccat      720
agaagtgatg gatggaacaa cagatgggtt ttagatgctg cattaaaagg aacttattcct      780

```

gaggatatga taaaaatctt tagcgataca aatattatgc ctgaactacc taaagagtta	840
tttactgagg tatttgaaac ttctgatttt ttaggaataa attattatac acgacaagtt	900
gtaaagaata actctgaagc ttttatcggt gctgaaagtg tagcaatgga taatcctaaa	960
acagaaatgg gttgggagat atatccgcaa gggctttatg atttgctaac gaggatacac	1020
agggattatg ggaacataga tttatacata acagaaaacg gtgcagcttt taatgatatg	1080
gttaatagag acggtaaagt tgaagatgaa aatagattag attatttata cactcatttt	1140
gctgctgcat taagtgctat agaagcggga gtacctttaa agggatatta tatttggtct	1200
ttcatggata attttgagtg ggctgaagga tatgaaaaaa gatttggaat agtacatgta	1260
aactataaaa ctcaggagag aacaataaag aagagtgctt attggtataa ggagcttata	1320
gaaagatcta ataagtaa	1338

FIG.1

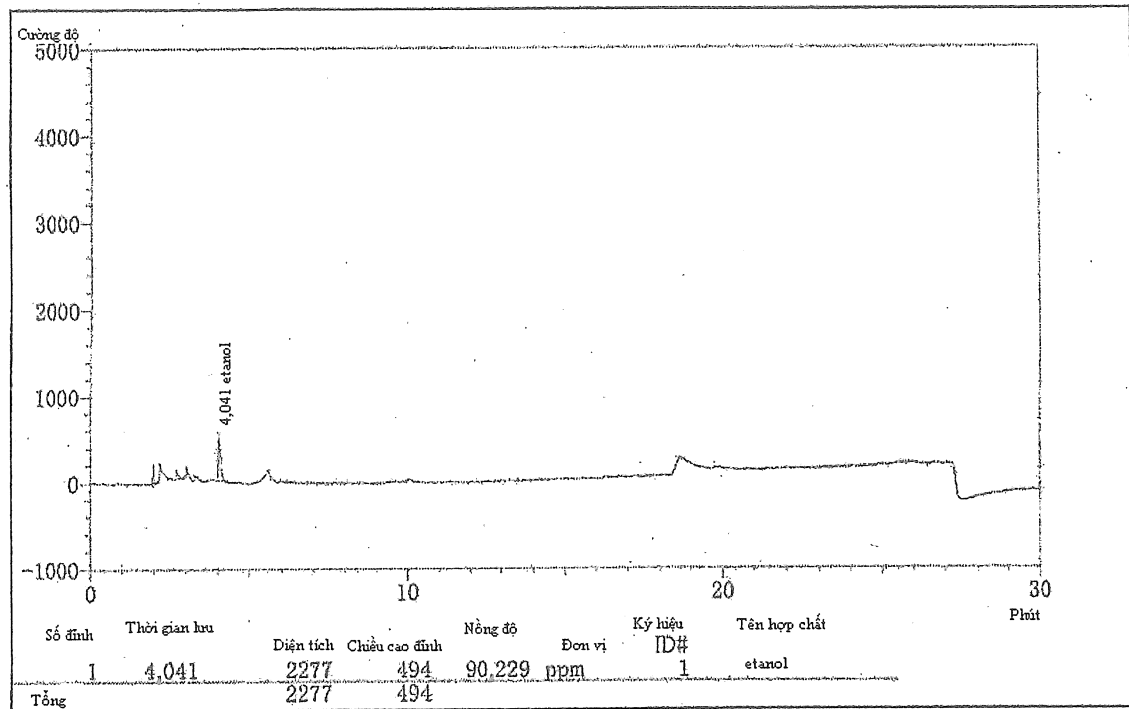


FIG.2

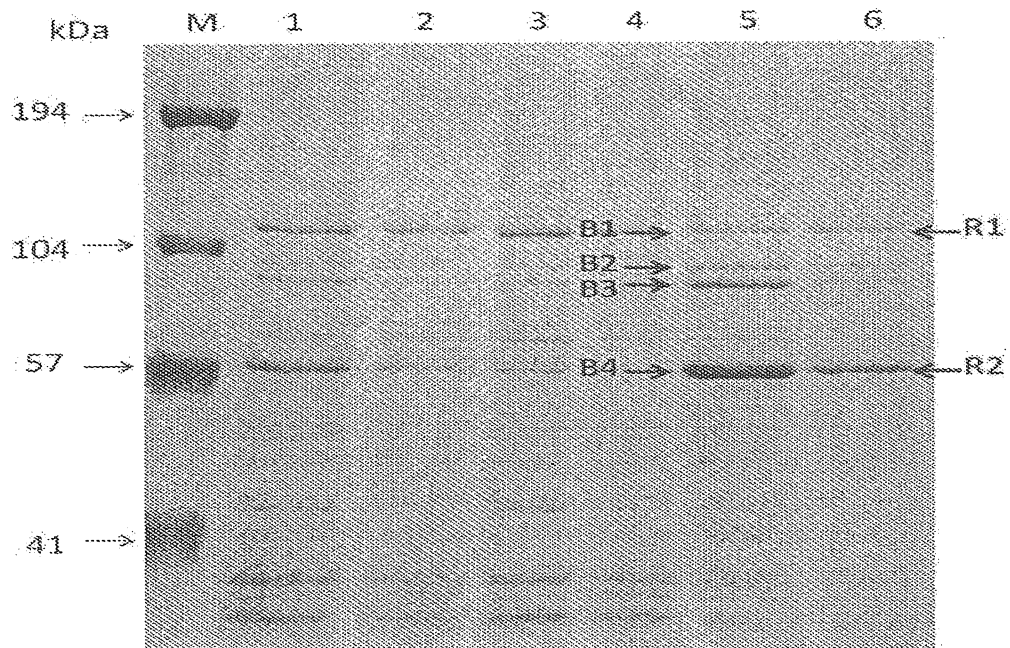


FIG.3

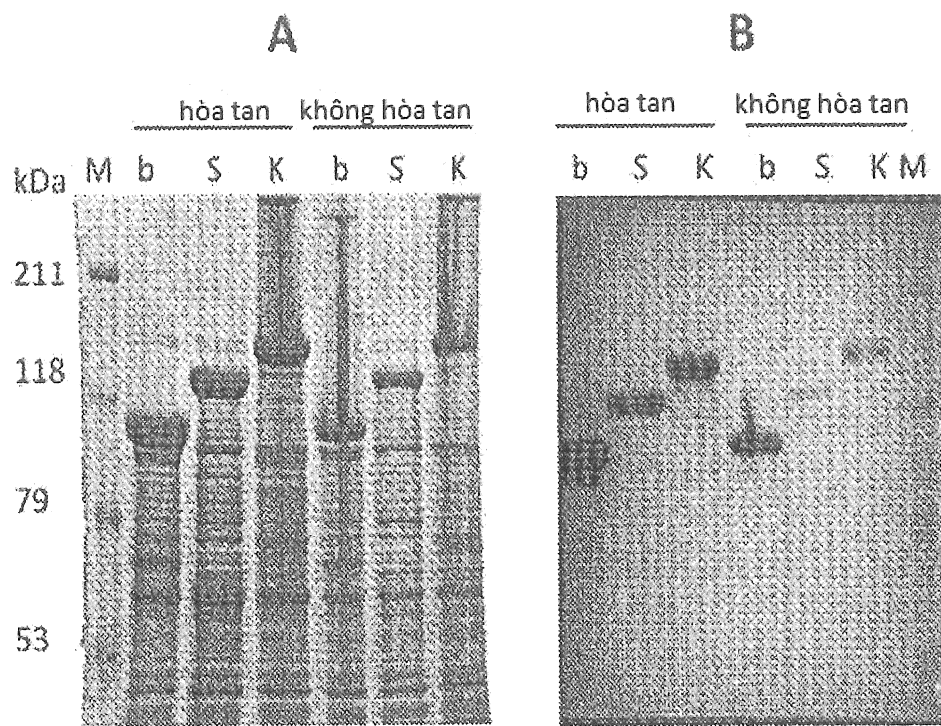


FIG.4

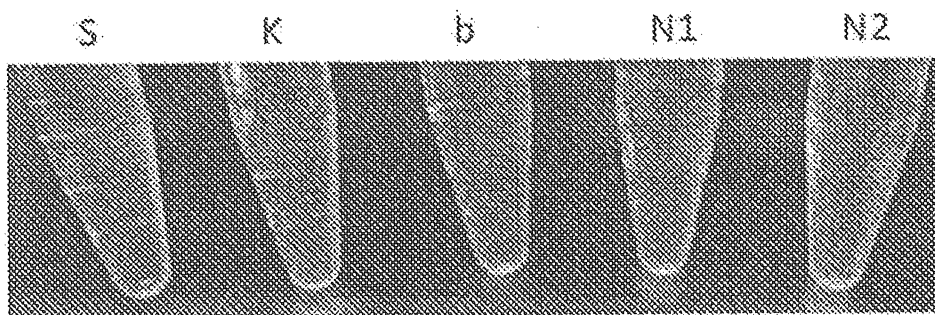


FIG.5

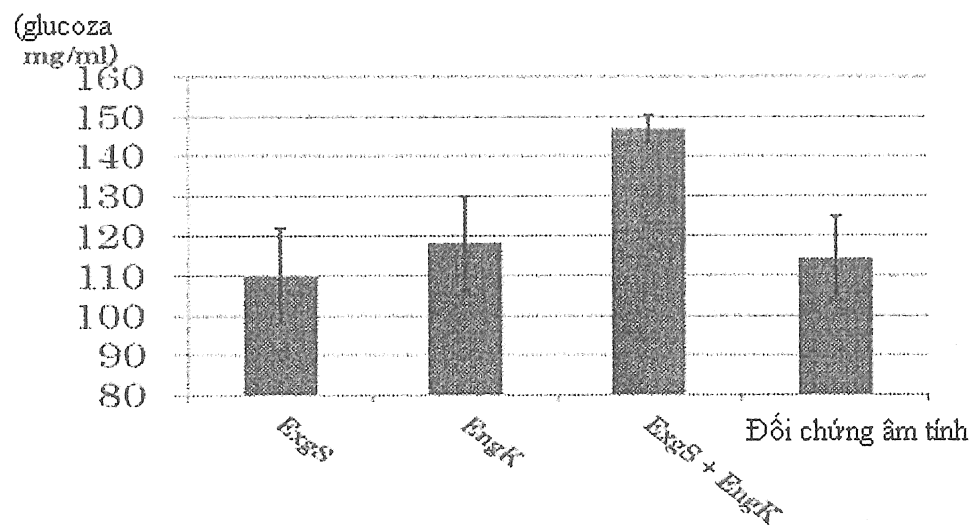
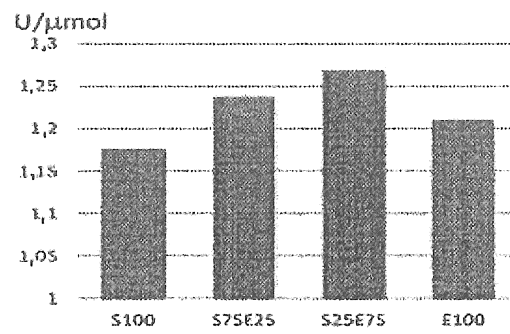
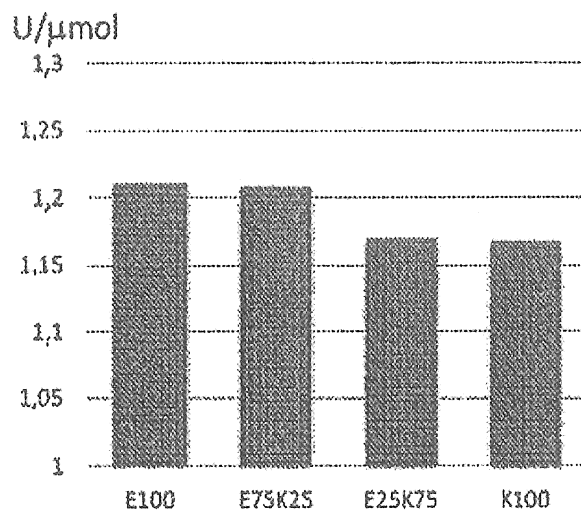


FIG.6

A.



B.



C.

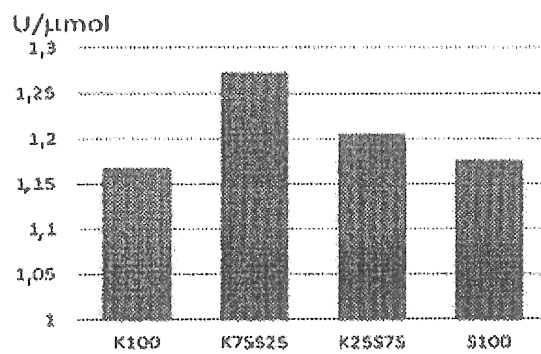


FIG.7

