



(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)



1-0026589

(51)⁷ C12N 15/09; C12Q 1/34; C12N 9/42

(13) B

(21) 1-2015-04666

(22) 08/12/2015

(30) 2014-252069 12/12/2014 JP

(45) 25/12/2020 393

(43) 27/06/2016 339A

(73) HONDA MOTOR CO., LTD. (JP)

1-1, Minami-Aoyama 2-chome, Minato-ku, Tokyo, 107-8556, Japan

(72) Jiro OKUMA (JP); Migiwa SUDA (JP); Asuka YAMAGUCHI (JP); Yoshitsugu HIROSE (JP); Yasuhiro KONDO (JP); Masaru SATO (JP); Daisuke SHIBATA (JP).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) ENZYM BETA-XYLOSIDAZA CHỊU NHIỆT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA ENZYM NÀY, VECTƠ BIỂU HIỆN ENZYM NÀY, THỂ BIẾN NẠP CHỨA VECTƠ NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ENZYM NÀY, HỖN HỢP GLYCOSIT HYDROLAZA CHỨA ENZYM NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM PHÂN GIẢI LIGNOXENLULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến enzym β -xylosidaza chịu nhiệt, polynucleotit mã hóa enzym này, vectơ biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vectơ này, phương pháp sản xuất enzym này, hỗn hợp glycosit hydrolaza chứa enzym này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza bằng enzym này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến enzym β -xylosidaza chịu nhiệt, polynucleotit mã hóa enzym này, vector biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vector này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza bằng enzym này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, việc phát triển các nguồn năng lượng thay thế dầu mỏ ngày càng trở nên quan trọng, do các vấn đề về môi trường như trái đất nóng lên và ô nhiễm bầu khí quyển, cũng như quan ngại liên quan đến việc cung cấp năng lượng cho các phương tiện vận tải. Sinh khối thực vật, nguồn năng lượng tái tạo phong phú nhất trên trái đất, được mong đợi là nguồn năng lượng thay thế cho dầu mỏ. Lignoxenluloza là thành phần chính của sinh khối thực vật và bao gồm các polysacarit như xenluloza, hemixenluloza (bao gồm xylan, arabinan và manan), và lignin. Các polysacarit này được thủy phân thành các monosacarit như glucoza và xyloza bởi nhiều glycosit hydrolaza và được sử dụng làm nhiên liệu sinh học hoặc nguyên liệu để sản xuất nhiều sản phẩm hóa học.

Lignoxenluloza là hợp chất có cấu trúc rất phức tạp, nên rất khó có thể phân giải hoặc thủy phân được bằng một enzym duy nhất. Do đó, trong số nhiều polysacarit, để thủy phân xenluloza thường cần ba loại enzym glycosit hydrolaza, bao gồm endoglucanaza (endo-1,4- β -D-glucanaza, EC 3.2.1.4), exo-xenlobiohydrolaza (1,4- β -xenlobiosidaza hoặc xenlobiohydrolaza, EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.176), và β -glucosidaza (EC 3.2.1.21). Mặt khác, mặc dù cấu trúc của hemixenluloza có thể thay đổi phụ thuộc vào loại thực vật, ví dụ xylan là thành phần chính có trong thực vật thân gỗ và thực vật thân thảo. Để thủy phân xylan thì cần có xylanaza (endo-1,4- β -xylanaza, EC 3.2.1.8) và β -xylosidaza (EC 3.2.1.37). β -xylosidaza là hydrolaza thủy phân oligosacarit được tạo ra khi thủy phân hemixenluloza bằng xylanaza để tạo ra monosacarit.

Trong quy trình sản xuất etanol sinh học thông thường, nguyên liệu lignoxenluloza có nồng độ chất rắn cao nằm trong khoảng từ 30% đến 60% đã được dùng để đạt được hiệu suất năng lượng và biến đổi thành etanol cao hơn. Tuy nhiên, khi dùng nồng độ chất rắn trong nguyên liệu cao như vậy, thì phản ứng enzym thủy phân lignoxenluloza hầu như không thể xảy ra do độ nhớt cao của dung dịch sinh khối đã thủy phân. Do đó, bằng cách thực hiện phản ứng thủy phân ở nhiệt độ cao, ví dụ ở nhiệt độ 80°C hoặc cao hơn và sử dụng enzym chịu nhiệt, thì có thể làm tăng tốc độ phản ứng thủy phân, và giảm được độ nhớt của dung dịch sinh khối đã thủy phân, nhờ vậy có thể rút ngắn được thời gian thủy phân và giảm lượng enzym cần sử dụng. Do đó, có nhu cầu phát triển toàn bộ các enzym glycosit hydrolaza có độ ổn định nhiệt cao hơn.

Nhiều glycosit hydrolaza chịu nhiệt đã được thu nhận bằng cách phân lập và xác định các vi sinh vật ưa nhiệt sống trong môi trường có nhiệt độ cao, tạo dòng các gen từ các vi sinh vật đã được phân lập và nuôi cấy này, và xác định trình tự ADN của chúng, sau đó biểu hiện chúng ở *E. coli*, nấm sợi hoặc các sinh vật tương tự. Ví dụ, Tài liệu Sáng chế 1 đề cập đến β -xylosidaza có nguồn gốc từ nấm sợi. Tài liệu Sáng chế 2 đề cập đến β -xylosidaza có nguồn gốc từ nấm sợi *Aspergillus oryzae* có hoạt tính enzym ở nhiệt độ 30°C. Tài liệu Sáng chế 3 đề cập đến β -xylosidaza có nguồn gốc từ *Alicyclobacillus acidocaldarius* có hoạt tính enzym ở độ pH = 5,5 hoặc thấp hơn và nhiệt độ 50°C hoặc cao hơn. Tài liệu Sáng chế 4 đề cập đến β -xylosidaza có nguồn gốc từ *Acremonium cellulolyticus* có hoạt tính enzym ở nhiệt độ 45°C. Ngoài ra, Tài liệu phi Sáng chế 1 đến 6 đề cập đến β -xylosidaza được phân lập từ vi khuẩn và nấm sợi đặc trưng có nhiệt độ tối ưu khoảng 60°C. Hơn nữa, Tài liệu phi Sáng chế 7 đề cập đến enzym β -xylosidaza chịu nhiệt có nhiệt độ tối ưu bằng 95°C. Tuy nhiên, mặc dù hiệu suất xúc tác K_{cat}/K_m của enzym này đối với cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit (PNPX - p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit) là rất mạnh và bằng 1173.4 mM⁻¹giây⁻¹, nhưng thời gian bán giảm của hoạt tính phân giải PNPX ở nhiệt độ 90°C chỉ khoảng 30 phút, do đó enzym này có độ ổn định nhiệt thấp.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu Sáng chế 1: Bản dịch tiếng Nhật đã công bố số Hei 11-507837 của Đơn PCT.

Tài liệu Sáng chế 2: Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số Hei 11-313683.

Tài liệu Sáng chế 3: Bản dịch tiếng Nhật đã công bố số 2011-523346 của Đơn PCT.

Tài liệu Sáng chế 4: Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2013-59272.

Tài liệu phi Sáng chế 1: Kormelink *et al.*, *Journal of Biotechnology*, **1993**, vol. 27, pp. 249-265.

Tài liệu phi Sáng chế 2: Herrmann *et al.*, *Biochemical Journal*, 1997, vol. 321, pp. 375-381.

Tài liệu phi Sáng chế 3: Kitamoto *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, pp. 20-24.

Tài liệu phi Sáng chế 4: La Grange *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, pp. 5512-5519.

Tài liệu phi Sáng chế 5: Shao *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 77, pp. 719-726.

Tài liệu phi Sáng chế 6: Morais *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, pp. 9213-9221.

Tài liệu phi Sáng chế 7: Shi *et al.*, *Biotechnology for Biofuels*, 2013, vol. 6, No. 27.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến enzym β -xylosidaza chịu nhiệt có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0, polynucleotit mã hóa enzym này, vector biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vector này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza bằng enzym này.

Để đạt được mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã thu nhận thành công β -xylosidaza chịu nhiệt có trình tự axit amin mới bằng cách tách chiết ADN trực tiếp từ đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng và thực hiện giải trình tự đa hệ gen của quần

thể vi sinh vật khó nuôi cấy lấy từ môi trường này và hoàn thành sáng chế này.

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt, polynucleotit, vector biểu hiện, thể biến nạp, phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt, hỗn hợp glycosit hydrolaza, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế được mô tả trong các phương án từ 1 đến 10 dưới đây.

1. Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt chứa vùng xúc tác β -xylosidaza bao gồm:

(A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;

(B) polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0; hoặc

(C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

2. Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo phương án 1, trong đó enzym này cũng có ít nhất một hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza.

3. Polynucleotit chứa miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza bao gồm:

(a) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;

(b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0;

(c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng

bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0; hoặc

(d) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

4. Polynucleotit theo phương án 3, trong đó polypeptit này cũng có ít nhất một hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza.

5. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo phương án 3 hoặc 4, trong đó vector này có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính β -xylosidaza ở tế bào vật chủ.

6. Thẻ biến nạp chứa vector biểu hiện theo phương án 5.

7. Thẻ biến nạp theo phương án 6, trong đó thẻ biến nạp này là sinh vật nhân thật.

8. Phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt bao gồm bước sản sinh enzym β -xylosidaza chịu nhiệt trong thẻ biến nạp theo phương án 6 hoặc 7.

9. Hỗn hợp glycosit hydrolaza chứa enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo phương án 1 hoặc 2, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo phương án 3 hoặc 4, hoặc enzym β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo phương án 8, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác.

10. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải lignoxenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa lignoxenluloza tiếp xúc với enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo phương án 1 hoặc 2, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo phương án 3 hoặc 4, thẻ biến nạp theo phương án 6 hoặc 7, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo phương án 8, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo phương án 9.

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính thủy phân cơ chất p-

nitrophenyl- β -D-xylopyranosit (PNPX) ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0. Do đó, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt này thích hợp để thủy phân nguyên liệu chứa lignoxenluloza ở nhiệt độ cao.

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng thích hợp để thủy phân nguyên liệu chứa hợp chất có liên kết β -xylosidic ở nhiệt độ cao. Nguyên liệu chứa hợp chất có liên kết β -xylosidic có thể được điều chế bằng cách thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza chứa hemixenluloza bằng xylanaza

Mặt khác, theo một khía cạnh khác, β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng thích hợp để thủy phân nguyên liệu chứa gốc arabinoza, đặc biệt là gốc arabinofuranoza hoặc arabinopyranoza.

Ngoài ra, polynucleotit, vector biểu hiện chứa polynucleotit này và thể biến nạp chứa vector này theo sáng chế cũng thích hợp để sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1A là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự nucleotit (nửa đoạn thứ nhất của SEQ ID NO.3) của khung đọc mã mở OJ1M-273 và trình tự nucleotit (SEQ ID NO.4) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1.

Fig.1B là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự nucleotit (nửa đoạn thứ hai của SEQ ID NO.3 tiếp theo Fig.1A) của khung đọc mã mở OJ1M-273 và trình tự nucleotit (SEQ ID NO.4) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin (SEQ ID NO.1) của khung đọc mã mở OJ1M-273 và trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 và trình tự axit amin (SEQ ID NO.9) của gen β -xylosidaza có nguồn gốc từ *Candidatus Caldatribacterium californiense*.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE của

protein OJ1M-273-1 thu được bằng cách biểu hiện gen OJ1M-273-1 ở *E. coli* trong ví dụ 1.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân các cơ chất tương ứng của protein OJ1M-273-1 được biểu hiện ở *E. coli* trong ví dụ 1 (tức là, hoạt tính tương đối với quy ước rằng hoạt tính thủy phân PNPX bằng 100%).

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PNPX (ở độ pH = 5,0) của protein OJ1M-273-1 được biểu hiện ở *E. coli* ở các nhiệt độ tương ứng trong ví dụ 1 (tức là, hoạt tính tương đối với quy ước rằng hoạt tính thủy phân ở nhiệt độ 105°C bằng 100%).

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PNPX (ở nhiệt độ 105°C) của protein OJ1M-273-1 được biểu hiện ở *E. coli* ở các độ pH tương ứng trong ví dụ 1 (tức là, hoạt tính tương đối với quy ước rằng hoạt tính thủy phân ở độ pH = 5,0 bằng 100%).

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá độ ổn định nhiệt (ở độ pH = 5,0) đối với hoạt tính thủy phân PNPX của protein OJ1M-273-1 được biểu hiện ở *E. coli* trong ví dụ 1 (tức là, hoạt tính tương đối với quy ước rằng hoạt tính thủy phân mẫu không được xử lý (thời gian giữ để phản ứng = 0 phút) bằng 100%).

Mô tả chi tiết sáng chế

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế

Nhiều vi sinh vật, bao gồm nấm sợi, vi khuẩn, và vi khuẩn cổ rất khó nuôi cấy và khoảng 99% vi sinh vật sống trong môi trường như đất vẫn chưa được biết đến. Đặc biệt, rất khó nuôi cấy được vi sinh vật sống trong môi trường có nhiệt độ cao, và chỉ tối đa khoảng 0,1% vi sinh vật sống trong đất có thể được phân lập và nuôi cấy bằng các kỹ thuật đã biết. Việc khó nuôi cấy vi sinh vật sống trong đất có nhiệt độ cao là một yếu tố cản trở sự phát triển các enzym chịu nhiệt.

Gần đây, nhờ sự phát triển của máy giải trình tự thế hệ tiếp theo cho phép giải trình tự được hàng tỷ cặp bazơ, nên đã có thể giải trình tự bộ gen của quần thể vi sinh vật sống trong đất và các môi trường tương tự. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, phương pháp

phân tích đa hệ gen đã được đề cập đến, trong đó ADN bộ gen của quần thể vi sinh vật được tổng hợp từ mẫu môi trường như đất, bộ gen của quần thể vi sinh vật có thành phần không đồng nhất được giải trình tự trực tiếp và toàn bộ, và dữ liệu trình tự được lắp ráp bằng máy tính song song, để thiết kế lại trình tự bộ gen của vi sinh vật. Phương pháp này góp phần rút ngắn thời gian giải trình tự bộ gen của vi sinh vật khó nuôi cấy.

Như được thể hiện trong ví dụ 1, các tác giả sáng chế đã chiết tách được ADN bộ gen (ADN đa hệ gen) của quần thể vi sinh vật sống trong đất có nhiệt độ cao thu được ở khu vực suối nước nóng (ví dụ, mẫu nước thu được ở khu vực suối nước nóng có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 58°C đến 78°C chứa đất, bùn, thảm vi sinh vật, màng sinh học và các loại tương tự), và thực hiện giải trình tự ADN của đa hệ gen này, kết quả là thu được các khung đọc mã mở (Open Reading Frame - ORF) mã hóa các trình tự axit amin tương đồng với β -glucosidaza hoặc β -xylosidaza đã biết (tức là, các trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 20% hoặc cao hơn và có trị số kỳ vọng (trị số E) nhỏ hơn $1e^{-20}$). Trong số các khung đọc mã mở này, các đoạn môi được thiết kế dựa trên thông tin trình tự nucleotit của các khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ trong đó sự có mặt của vùng xúc tác β -glucosidaza hoặc vùng xúc tác β -xylosidaza có thể được xác định, và các gen tiềm năng được tách dòng từ ADN đa hệ gen của quần thể vi sinh vật sống trong đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp PCR. Các ADN đã được tách dòng bằng PCR được biến nạp vào *E. coli*, và các protein mã hóa bởi các trình tự nucleotit này được biểu hiện và sàng lọc chức năng bằng cách đo hoạt tính phân giải PNPX. Cuối cùng, thu được β -xylosidaza chịu nhiệt có hoạt tính phân giải PNPX (sau đây gọi tắt là "OJ1M-273-1" hoặc "dòng gen OJ1M-273-1") từ các khung đọc mã mở này. Trình tự axit amin của OJ1M-273-1 như nêu trong SEQ ID NO.2 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của OJ1M-273-1 như nêu trong SEQ ID NO.4.

Như được thể hiện trong Ví dụ 1, OJ1M-273-1 có hoạt tính thủy phân mạnh PNPX, p-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosit (sau đây gọi tắt là PNPAF), và p-nitrophenyl- α -L-arabinopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPAP), và cũng có hoạt tính thủy phân mạnh arabinan và arabinogalactan. Ngoài ra, OJ1M-273-1 cũng có hoạt tính thủy phân yếu p-nitrophenyl- β -D-glucopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPG) và xylan.

Kết quả phân tích độ đặc hiệu cơ chất này chứng tỏ rằng OJ1M-273-1 là glycosit

hydrolaza có ít nhất hoạt tính β -xylosidaza và cũng có hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và α -L-arabinopyranosidaza, tức là OJ1M-273-1 là enzym đa chức năng rất hữu ích.

Hơn nữa, thời gian bán giảm hoạt tính phân giải PNPX của OJ1M-273-1 ($T_{1/2}$) bằng khoảng 180 phút ở cả nhiệt độ 90°C lẫn nhiệt độ 95°C, và khoảng 130 phút ở nhiệt độ 100°C. Do đó, β -xylosidaza theo sáng chế, bao gồm OJ1M-273-1 có độ ổn định nhiệt rất cao, và rất thích hợp để thủy phân hemixenluloza ở nhiệt độ cao.

Thuật ngữ “hoạt tính β -xylosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính enzym thủy phân nguyên liệu chứa hợp chất có liên kết β -xylosidic và hoạt tính thủy phân cơ chất PNPX.

Thuật ngữ “hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính enzym thủy phân nguyên liệu chứa gốc arabinofuranoza, và hoạt tính thủy phân cơ chất PNPAF.

Thuật ngữ “hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính enzym thủy phân nguyên liệu chứa gốc arabinopyranoza và hoạt tính thủy phân cơ chất PNPAF.

Thuật ngữ “có hoạt tính” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính trên ít nhất một cơ chất và tạo ra độ chênh lệch đáng kể về hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất đã được thủy phân so với mẫu đối chứng âm.

Thuật ngữ “có hoạt tính β -xylosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính trên ít nhất một cơ chất PNPX và tạo ra độ chênh lệch đáng kể về hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất đã được thủy phân so với mẫu đối chứng âm.

Thuật ngữ “có hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính trên ít nhất một cơ chất PNPAF và tạo ra độ chênh lệch đáng kể về hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất đã được thủy phân so với mẫu đối chứng âm.

Thuật ngữ “có hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính trên ít nhất một cơ chất PNPAF và tạo ra độ chênh lệch đáng kể về

hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất đã được thủy phân so với mẫu đối chứng âm.

Kết quả tra cứu trình tự axit amin của OJ1M-273-1 bằng cơ sở dữ liệu trình tự axit amin đã biết cho thấy trình tự axit amin của OJ1M-273-1 có độ tương đồng cao nhất với trình tự axit amin của β -xylosidaza GH3 (SEQ ID NO.9) (mã truy cập Ngân hàng Gen: WP_026140775.1) có nguồn gốc từ *Candidatus Caldatribacterium californiense*, và bằng 62% đối với toàn bộ chiều dài trình tự và 65% đối với vùng xúc tác GH3. Các phân tích độ đặc hiệu cơ chất, và phân tích độ tương đồng của trình tự axit amin này với các protein đã biết cũng cho thấy OJ1M-273-1 là β -xylosidaza GH3 thể hệ mới.

OJ1M-273-1 có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit (tức là hoạt tính β -xylosidaza) ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0. Cụ thể, như được thể hiện trong ví dụ 1, OJ1M-273-1 có hoạt tính β -xylosidaza ở khoảng nhiệt độ rộng nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C, và khoảng pH rộng nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Cụ thể hơn, hoạt tính β -xylosidaza của OJ1M-273-1 tăng khi nhiệt độ tăng nằm trong khoảng từ 70°C đến 105°C, nhưng giảm nhanh khi nhiệt độ trên 105°C.

Nhìn chung, ở protein có một số hoạt tính sinh học, một hoặc nhiều axit amin có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung, mà không làm giảm hoạt tính sinh học của protein này. Nói cách khác, trong OJ1M-273-1, một hoặc nhiều axit amin cũng có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung mà không làm giảm hoạt tính thủy phân glycosit của enzym này, bao gồm hoạt tính β -xylosidaza.

Cụ thể, β -xylosidaza theo sáng chế là glycosit hydrolaza chịu nhiệt chứa vùng xúc tác β -xylosidaza gồm polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A) đến (C) sau.

(A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 (tức là, khung đọc mã mở OJ1M-273 hoặc dòng gen OJ1M-273-1);

(B) polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0; hoặc

(C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

Thuật ngữ “polypeptit đã loại bỏ axit amin” được dùng trong bản mô tả để chỉ đoạn axit amin mà tạo ra polypeptit bị khuyết đoạn (loại bỏ).

Thuật ngữ “polypeptit đã thay thế axit amin” được dùng trong bản mô tả để chỉ axit amin mà tạo ra polypeptit được thay thế bằng axit amin khác.

Thuật ngữ “polypeptit đã bổ sung axit amin” được dùng trong bản mô tả để chỉ axit amin mới được chèn vào polypeptit.

Trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 là trình tự axit amin mã hóa bởi khung đọc mã mở OJ1M-273 (SEQ ID NO.1), được phân lập từ mẫu đất thu được ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp mô tả trong ví dụ 1, và kết quả phân tích cơ sở dữ liệu cho thấy khung đọc mã mở này là khung đọc mã mở mã hóa gen β -glucosidaza hoặc gen β -xylosidaza.

Trong polypeptit (B), tốt hơn nếu số lượng axit amin được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 10, và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Trong polypeptit (C), không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 miễn là độ tương đồng nằm trong khoảng từ 75% đến 100%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 85% đến 100%, còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 90% đến 100%, còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 95% đến 100% và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 98% đến 100%.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự axit amin được xác định bằng phương pháp sau: ở trạng thái, trong đó khoảng trống được tạo ra ở các vị trí xuất hiện đột biến chèn thêm hoặc loại bỏ, hai trình tự axit amin được đặt cạnh nhau sao cho

các axit amin tương ứng là giống nhau; và tỷ lệ axit amin giống nhau so với tổng số trình tự axit amin trừ đi khoảng trống trên trình tự sắp thẳng hàng được xác định là độ tương đồng trình tự. Độ tương đồng giữa các trình tự axit amin có thể được xác định bằng nhiều phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Theo sáng chế, độ tương đồng của các trình tự axit amin được xác định dựa trên trình tự sắp thẳng hàng thu được bằng phần mềm tra cứu độ tương đồng BLASTP.

Các polypeptit (B) và (C) có thể được thiết kế nhân tạo hoặc cũng có thể là thể tương đồng của OJ1M-273-1 hoặc các biến thể tương tự, hoặc các đoạn protein của chúng.

Các polypeptit từ (A) đến (C) có thể lần lượt được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự axit amin, hoặc cũng có thể được tạo ra bởi hệ biểu hiện protein sử dụng polynucleotit theo sáng chế. Ngoài ra, các polypeptit (B) và (C) cũng có thể lần lượt được tổng hợp nhân tạo dựa trên polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen để chèn thêm đột biến axit amin.

Các polypeptit từ (A) đến (C) có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit (hoạt tính β -xylosidaza) ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0. Do đó, khi enzym chứa vùng xúc tác β -xylosidaza là polypeptit bất kỳ từ (A) đến (C), thì có thể thu được β -xylosidaza chịu nhiệt.

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính thủy phân cơ chất PNPX. Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt này cũng có hoạt tính thủy phân cơ chất β -glucan hoặc oligosacarit hoặc các cơ chất tương tự khác. Ví dụ về các cơ chất khác của enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế bao gồm PNPAF, PNPAF, PNPG, p-nitrophenyl- β -D-fucopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPbdfP), p-nitrophenyl- β -L-arabinopyranosit, p-nitrophenyl- β -D-mannopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPMF), p-nitrophenyl- α -D-galactopyranosit, p-nitrophenyl- β -D-galactopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPGA), p-nitrophenyl- α -L-fucopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPFfP), p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPRP), và p-nitrophenyl- α -D-xylopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPdX); glucan chứa gốc đường arabinosa, như arabinan và arabinogalactan; xylan; glucan chứa liên kết β -1,3 và β -1,4 như lichenan; xenluloza tinh thể như Avicel, xenluloza vi tinh thể vi khuẩn (sau đây gọi tắt là BMCC) và giấy lọc;

xenluloza phi tinh thể như Avicel tương ứng liên hợp axit phosphoric (sau đây gọi tắt là PSA); glucan chứa liên kết β -1,4 như CMC; oligosacarit chứa liên kết β -1,4 như xenlobioza; glucan chứa liên kết β -1,3 và β -1,6 như laminarin; glucan chứa liên kết β -1,3; glucan chứa liên kết β -1,6; và oligosacarit chứa liên kết β -1,6 như gentiobioza. Ngoài PNPX, thì tốt hơn nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có hoạt tính thủy phân ít nhất một cơ chất được chọn từ nhóm bao gồm PNPAF, PNPAP, PNPG, PNPbDFP, arabinan, arabinogalactan và xylan, tốt hơn nữa nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có hoạt tính thủy phân PNPX, PNPAF, PNPAP, arabinan, arabinogalactan, PNPG và xylan, và còn tốt hơn nữa nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có hoạt tính thủy phân PNPX, PNPAF, PNPAP, arabinan và arabinogalactan.

Tốt hơn nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính phân giải PNPX (hoạt tính β -xylosidaza) ít nhất ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 90°C đến 110°C, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 110°C, và còn tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C. Tốt hơn nếu nhiệt độ tối ưu của β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế nằm trong khoảng từ 90°C đến 110°C và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 100°C đến 110°C.

Thuật ngữ “chịu nhiệt” được dùng trong bản mô tả để chỉ β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, tức là β -xylosidaza có hoạt tính β -xylosidaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C.

Độ pH tối ưu của β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0. Tốt hơn nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính β -xylosidaza ít nhất ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0.

Ngoài hoạt tính β -xylosidaza, thì enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có hoạt tính glycosit hydrolaza khác. Ví dụ về các hoạt tính glycosit hydrolaza khác bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza, hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza, hoạt tính endoglucanaza, hoạt tính xylanaza, hoạt tính β -glucosidaza hoặc hoạt tính xenlobiohydrolaza. Tốt hơn nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có ít nhất một hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza ngoài hoạt tính β -xylosidaza và tốt hơn nữa nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có toàn bộ hoạt tính β -xylosidaza, hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza

và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza.

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể chỉ chứa vùng xúc tác β -xylosidaza bao gồm polypeptit bất kỳ từ (A) đến (C), hoặc có thể chứa các vùng khác ngoài vùng xúc tác β -xylosidaza. Ví dụ về các vùng khác bao gồm vùng khác với vùng xúc tác enzym của β -xylosidaza đã biết. Ví dụ, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng bao gồm các enzym thu được bằng cách thay thế vùng xúc tác enzym của β -xylosidaza đã biết bằng các polypeptit từ (A) đến (C).

Khi β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế chứa một hoặc nhiều vùng khác ngoài vùng xúc tác β -xylosidaza, thì tốt hơn nếu enzym này chứa vùng Fibronectin loại III.

Vùng Fibronectin loại III có thể nằm trước (ở đầu tận cùng N) hoặc nằm sau (ở đầu tận cùng C) so với vùng xúc tác β -xylosidaza. Ngoài ra, vùng Fibronectin loại III và vùng xúc tác β -xylosidaza có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc thông qua gốc liên kết có chiều dài thích hợp. Tốt hơn nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế chứa vùng Fibronectin loại III nằm trước hoặc nằm sau vùng xúc tác β -xylosidaza thông qua gốc liên kết, tốt hơn nữa nếu β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế chứa vùng Fibronectin loại III nằm sau vùng xúc tác β -xylosidaza thông qua gốc liên kết.

Ngoài ra, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể cũng chứa peptit tín hiệu cho phép định vị enzym này vào vùng đặc hiệu trong tế bào, hoặc peptit tín hiệu tạo ra tác dụng bài tiết enzym này ra ngoài tế bào ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Ví dụ về các peptit tín hiệu này bao gồm peptit tín hiệu vận chuyển không bào, peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất, peptit tín hiệu vận chuyển nhân, và peptit tín hiệu bài tiết. Ví dụ cụ thể về peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất bao gồm peptit tín hiệu chứa trình tự axit amin HDEL. Khi chứa peptit tín hiệu ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C, thì β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện ở thể biến nạp theo sáng chế có thể được bài tiết ra ngoài tế bào hoặc được định vị trong mạng lưới nội chất hoặc vùng bên trong tương tự của tế bào.

Ngoài ra, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có thể chứa các trình tự đánh dấu khác nhau ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C để cho phép tinh chế dễ dàng và hiệu quả khi sản xuất enzym này bằng hệ biểu hiện. Các trình tự đánh dấu His,

trình tự đánh dấu hemagglutinin (HA), trình tự đánh dấu Myc, và trình tự đánh dấu Flag để biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp có thể được sử dụng làm trình tự đánh dấu.

Nói cách khác, theo một khía cạnh, β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế chứa vùng xúc tác β -xylosidaza gồm polypeptit bất kỳ từ (A) đến (C) nêu trên; và khi cần enzym này cũng chứa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fibronectin loại III nằm trước hoặc nằm sau vùng xúc tác β -xylosidaza, gốc liên kết, peptit tín hiệu được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của β -xylosidaza chịu nhiệt này, trình tự đánh dấu được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của β -xylosidaza chịu nhiệt này, và đoạn gắn kết xenluloza.

Polynucleotit mã hóa enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế

Polynucleotit nêu trên mã hóa enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế. β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sản xuất bằng hệ biểu hiện của vật chủ thu được bằng cách chèn vector biểu hiện chứa polynucleotit này vào vật chủ.

Cụ thể hơn, polynucleotit theo sáng chế chứa miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza, gồm trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a) đến (e) sau:

(a) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2.

(b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

(c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

(d) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng

105°C và độ pH bằng 5,0.

(e) trình tự nucleotit của polynucleotit lai hóa với polynucleotit chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4 trong điều kiện nghiêm ngặt, và trình tự nucleotit này mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

Thuật ngữ “polynucleotit đã loại bỏ nucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ đoạn nucleotit mà tạo ra polynucleotit bị khuyết đoạn (loại bỏ).

Thuật ngữ “polynucleotit đã thay thế nucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ nucleotit mà tạo ra polynucleotit được thay bằng nucleotit khác.

Thuật ngữ “polynucleotit đã bổ sung nucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ nucleotit mới được chèn vào polynucleotit.

Ví dụ về “các điều kiện nghiêm ngặt” theo sáng chế bao gồm phương pháp được mô tả trong tài liệu: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual Third Edition* (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Ví dụ, các điều kiện trong dung dịch đệm lai hóa SSC 6 $\times$ (thành phần của dung dịch SSC 20 $\times$: 3M natri clorua, 0,3M dung dịch axit xitric, độ pH bằng 7,0), dung dịch Denhardt 5 $\times$ (thành phần dung dịch Denhardt 100 $\times$: 2% khối lượng albumin huyết thanh bò, 2% khối lượng ficoll, 2% khối lượng polyvinylpyrrolidon), 0,5% khối lượng SDS, 0,1mg/mL ADN tinh trùng cá hồi, và 50% formamit, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 70°C trong vài giờ đến qua đêm. Sau khi ủ, tốt hơn nếu dung dịch SSC 1 $\times$ chứa 0,1% khối lượng SDS được sử dụng làm dung dịch đệm rửa, và tốt hơn nữa nếu dung dịch SSC 0,1 $\times$ chứa 0,1% khối lượng SDS được sử dụng làm dung dịch đệm rửa.

Từ các trình tự nucleotit từ (a) đến (e), có thể chọn lọc được bộ ba mã hóa thoái biến có tần xuất sử dụng cao ở vật chủ. Ví dụ, trình tự nucleotit (a) có thể là trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3, trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4, hoặc trình tự nucleotit thu được bằng cách cải biến để có bộ ba mã hóa có tần xuất sử dụng cao ở vật chủ mà không làm biến đổi trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4. Các bộ ba mã hóa này có thể được cải biến bằng kỹ thuật cải biến trình tự gen hoặc tổng hợp gen nhân tạo đã biết.

Polynucleotit có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4 có thể được tổng hợp hóa học dựa trên thông tin về trình tự nucleotit hoặc polynucleotit này có thể được tổng hợp dưới dạng gen mã hóa OJ1M-273-1 có chiều dài đầy đủ (sau đây gọi tắt là “gen OJ1M-273-1”) hoặc một đoạn gen của nó chứa vùng xúc tác β -xylosidaza từ tự nhiên bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Gen OJ1M-273-1 có chiều dài đầy đủ hoặc một đoạn gen của nó có thể được tổng hợp bằng cách thu nhận mẫu chứa quần thể vi sinh vật tự nhiên; và thực hiện phương pháp PCR với khuôn là ADN bộ gen thu được từ mẫu, cũng như đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược được thiết kế dựa trên trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4. ADN bổ sung (ADNbs) được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược từ khuôn là ARN thông tin thu được từ mẫu cũng có thể được sử dụng làm khuôn.

Tốt hơn nếu mẫu để thu nhận khuôn axit nucleic là mẫu thu được từ môi trường có nhiệt độ cao, như đất ở khu vực suối nước nóng.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng của trình tự nucleotit (d) so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4 miễn là độ tương đồng nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 85% đến 100%, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 90% đến 100%, và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 95% đến 100.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự nucleotit được xác định bằng phương pháp sau: ở trạng thái trong đó khoảng trống được tạo ra ở các vị trí xuất hiện đột biến chèn thêm hoặc loại bỏ, hai trình tự nucleotit được đặt cạnh nhau sao cho các trình tự nucleotit tương ứng là giống nhau; và tỷ lệ các trình tự nucleotit giống nhau so với tổng số trình tự nucleotit trừ đi khoảng trống trên trình tự sắp thẳng hàng được xác định là độ tương đồng trình tự. Độ tương đồng trình tự giữa các trình tự nucleotit có thể được xác định bằng nhiều phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Theo sáng chế, độ tương đồng của các trình tự nucleotit được xác định dựa trên trình tự sắp thẳng hàng thu được bằng phần mềm tra cứu độ tương đồng BLASTN đã biết.

Ví dụ, polynucleotit chứa trình tự nucleotit (b), (c), hoặc (d) có thể lần lượt được tổng hợp nhân tạo bằng cách loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung một hoặc nhiều nucleotit trên polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4.

Ngoài ra, trình tự nucleotit (b), (c), hoặc (d) cũng có thể là trình tự có chiều dài đầy đủ của gen tương đồng với gen OJ1M-273-1 hoặc một đoạn trình tự của nó. Gen tương đồng của gen OJ1M-273-1 có thể thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen dùng để thu nhận gen tương đồng của gen có trình tự nucleotit đã biết.

Polynucleotit theo sáng chế có thể chỉ chứa miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza, hoặc ngoài miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza, thì polynucleotit theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều miền khác bao gồm miền mã hóa đoạn gắn kết xenluloza, gốc liên kết, các petit tín hiệu khác nhau, các trình tự đánh dấu khác nhau, hoặc các trình tự tương tự.

Nói cách khác, theo một khía cạnh, polynucleotit theo sáng chế chứa miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza, gồm trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a) đến (e) nêu trên, và khi cần polynucleotit này cũng chứa miền mã hóa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fibronectin loại III, đoạn gắn kết xenluloza, gốc liên kết, peptit tín hiệu và trình tự đánh dấu.

Vector biểu hiện theo sáng chế

Vector biểu hiện theo sáng chế chứa polynucleotit theo sáng chế và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0 ở tế bào vật chủ. Nói cách khác, vector này là vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế. Đặc biệt, cần chèn cat-xet biểu hiện chứa, từ đoạn nằm trước, ADN có trình tự vùng khởi đầu, polynucleotit theo sáng chế, và ADN có trình tự vùng kết thúc vào vector biểu hiện này. Polynucleotit theo sáng chế có thể được biến nạp vào vector biểu hiện này bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết. Kit tổng hợp vector biểu hiện có bán trên thị trường cũng có thể được sử dụng để biến nạp polynucleotit vào vector biểu hiện.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” được dùng trong bản mô tả để chỉ vector chứa, từ đoạn nằm trước, ADN có trình tự vùng khởi đầu, ADN có trình tự để kết hợp AND ngoại sinh, và ADN có trình tự vùng kết thúc.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể được chèn vào tế bào nhân sơ như *E. coli* hoặc tế bào nhân thật như nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú,

hoặc tế bào thực vật. Vector bất kỳ tương tích với vật chủ có thể được sử dụng làm vector biểu hiện theo sáng chế.

Tốt hơn nữa, vector biểu hiện theo sáng chế không chỉ chứa polynucleotit theo sáng chế, mà còn chứa gen kháng thuốc hoặc gen tương tự. Điều này cho phép dễ dàng chọn lọc được tế bào vật chủ đã chuyển gen và tế bào vật chủ chưa chuyển gen bằng vector này.

Ví dụ về gen kháng thuốc bao gồm gen kháng kanamycin, gen kháng hygromycin và gen kháng bialaphos.

Thế biến nạp theo sáng chế

Thế biến nạp nêu trên chứa vector biểu hiện theo sáng chế. β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được biểu hiện ở thế biến nạp này. Vật chủ để chèn vector biểu hiện theo sáng chế có thể là tế bào nhân sơ như *E. coli*, hoặc tế bào nhân thật như nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật. Nói cách khác, ví dụ về thế biến nạp theo sáng chế bao gồm *E. coli*, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, hoặc tế bào thực vật chứa vector biểu hiện theo sáng chế.

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sản xuất một cách đơn giản với lượng lớn bằng cách nuôi cấy thế biến nạp *E. coli* này. Mặt khác, do protein bị glycosyl hóa ở tế bào nhân thật, nên enzym β -xylosidaza chịu nhiệt có độ ổn định nhiệt rất cao có thể được sản xuất bằng tế bào nhân thật chứ không bằng tế bào nhân sơ.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp sản xuất thế biến nạp theo sáng chế bằng cách sử dụng vector biểu hiện và thế biến nạp theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp thông thường. Ví dụ về các phương pháp sản xuất thế biến nạp bao gồm phương pháp sốc nhiệt, phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, phương pháp súng hạt, phương pháp xung điện, và phương pháp chuyển gen nhờ polyetylen glycol. Khi vật chủ là tế bào thực vật, tốt hơn nếu thế biến nạp theo sáng chế được sản xuất bằng phương pháp súng hạt hoặc phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*.

Khi tế bào nhân sơ, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú hoặc các tế bào tương tự được sử dụng làm vật chủ, thì thế biến nạp thu được có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường giống như phương pháp nuôi cấy vật chủ chưa

chuyển gen.

Phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế

Phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế chế là phương pháp để sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt trong thể biến nạp theo sáng chế. Khi nuôi cấy thể biến nạp được sản xuất bằng cách sử dụng vector biểu hiện chứa polynucleotit theo sáng chế nằm sau vùng khởi đầu mà không có khả năng điều hòa thời gian biểu hiện hoặc các yếu tố tương tự, thì β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện liên tục. Mặt khác, trong thể biến nạp được sản xuất bằng cách sử dụng vùng khởi đầu cảm ứng biểu hiện để cảm ứng biểu hiện bằng hợp chất đặc hiệu, điều kiện nhiệt độ đặc hiệu, hoặc các yếu tố tương tự, thì β -xylosidaza chịu nhiệt được biểu hiện trong thể biến nạp này bằng cách nuôi cấy thể biến nạp và thực hiện cảm ứng phù hợp với điều kiện cảm ứng biểu hiện tương ứng

Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng thể biến nạp có thể được sử dụng ở trạng thái nằm trong thể biến nạp, hoặc có thể được chiết xuất/tinh chế từ thể biến nạp.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp chiết xuất hoặc tinh chế β -xylosidaza chịu nhiệt từ thể biến nạp miễn là phương pháp này không làm giảm hoạt tính của β -xylosidaza chịu nhiệt, và phương pháp thông thường để chiết xuất polypeptit từ tế bào hoặc mô sinh học có thể được sử dụng. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm phương pháp, trong đó thể biến nạp được ngâm trong dung dịch đệm thích hợp để chiết xuất β -xylosidaza chịu nhiệt, sau đó dịch chiết thu được và bã rắn được phân tách. Tốt hơn nếu dung dịch đệm này chứa chất làm tăng độ hòa tan như chất hoạt động bề mặt. Khi thể biến nạp là thực vật, thì thể biến nạp có thể được băm hoặc cắt trước khi ngâm trong dung dịch đệm. Hơn nữa, phương pháp phân tách rắn-lỏng đã biết như phương pháp lọc, phương pháp lọc nén, hoặc phương pháp ly tâm có thể được sử dụng để phân tách dịch chiết và bã rắn, hoặc thể biến nạp được ngâm trong dung dịch đệm có thể được ép. β -xylosidaza chịu nhiệt trong dịch chiết có thể được tinh chế bằng phương pháp đã biết như phương pháp kết tinh muối, phương pháp siêu lọc, hoặc phương pháp sắc ký.

Khi enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện ở trạng thái có

peptit tín hiệu bài tiết nằm trong thể biến nạp, thì dung dịch chứa β -xylosidaza chịu nhiệt có thể được thu nhận dễ dàng bằng cách nuôi cấy thể biến nạp, sau đó thu gom phần dịch nổi nuôi cấy bằng cách loại bỏ thể biến nạp ra khỏi dịch nuôi cấy thu được. Hơn nữa, khi β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có trình tự đánh dấu như trình tự đánh dấu His, thì β -xylosidaza chịu nhiệt trong dịch chiết hoặc dịch nổi nuôi cấy có thể được tinh chế dễ dàng bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng trình tự đánh dấu này.

Nói cách khác, phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế bao gồm bước sản sinh β -xylosidaza chịu nhiệt trong thể biến nạp theo sáng chế, sau đó là bước chiết xuất và tinh chế β -xylosidaza chịu nhiệt từ thể biến nạp (khi cần).

Hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế

Hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên chứa β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, hoặc β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác. β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sử dụng ở trạng thái nằm trong thể biến nạp theo sáng chế hoặc có thể được chiết xuất hoặc tinh chế từ thể biến nạp này. Khi hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế được sử dụng để thủy phân polysacarit, thì có thể phân giải hiệu quả nguyên liệu lignoxenluloza chứa xenluloza, hemixenluloza và lignin.

Không có giới hạn cụ thể về glycosit hydrolaza khác bên cạnh β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế miễn là nó có hoạt tính thủy phân lignoxenluloza. Ví dụ về glycosit hydrolaza khác bao gồm hemixenlulaza như xylanaza, cũng như xenlobiohydrolaza, β -glucosidaza và endoglucanaza. Tốt hơn nếu ngoài β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, thì hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế còn chứa ít nhất một glycosit hydrolaza được chọn từ hemixenlulaza và endoglucanaza và tốt hơn nữa nếu hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa cả hemixenlulaza lẫn endoglucanaza. Đặc biệt, tốt hơn nếu ngoài β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế thì hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế còn chứa ít nhất một glycosit hydrolaza được chọn từ nhóm bao gồm xylanaza, β -xylosidaza, xenlobiohydrolaza, và endoglucanaza; và tốt hơn nữa nếu hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa toàn bộ xylanaza, β -xylosidaza, xenlobiohydrolaza, và endoglucanaza.

Tốt hơn nếu glycosit hydrolaza khác chứa trong hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C, và tốt hơn nữa nếu enzym này là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính ở nhiệt độ ít nhất bằng 85°C và tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C. Khi hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa toàn bộ các enzym chịu nhiệt (tức là, có nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính enzym hoặc nhiệt độ biến tính của protein enzym bằng 70°C hoặc cao hơn), thì có thể thủy phân hiệu quả nguyên liệu chứa lignoxenluloza bằng hỗn hợp glycosit hydrolaza này ở điều kiện nhiệt độ cao. Nói cách khác, khi hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chỉ chứa glycosit hydrolaza chịu nhiệt được sử dụng để thủy phân nguyên liệu chứa lignoxenluloza, thì có thể thực hiện phản ứng thủy phân nguyên liệu này ở nhiệt độ cao nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C (tức là thủy phân ở nhiệt độ cao). Khi thủy phân nguyên liệu này ở nhiệt độ cao, thì lượng enzym, thời gian thủy phân và chi phí cho phản ứng thủy phân có thể giảm đáng kể.

Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế

Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế (ví dụ, sản phẩm phân giải chứa monosacarit như glucoza, xyloza hoặc arabinoza), bao gồm bước thủy phân oligosacarit được tạo ra bằng cách thủy phân hemixenluloza bằng xylanaza hoặc xenluloza bằng xenlobiohydrolaza thành monosacarit bằng β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế.

Cụ thể, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế là phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải của nguyên liệu chứa lignoxenluloza, sản phẩm phân giải containing sản phẩm phân giải của hemixenluloza, sản phẩm phân giải của xenluloza, hoặc cả sản phẩm phân giải của hemixenluloza lẫn sản phẩm phân giải của xenluloza, bằng cách cho nguyên liệu chứa lignoxenluloza, như nguyên liệu chứa lignoxenluloza mà chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza và hemixenluloza tiếp xúc với enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, thể biến nạp theo sáng chế, β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế.

Không có giới hạn cụ thể về nguyên liệu chứa lignoxenluloza, miễn là nguyên liệu này chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hemixenluloza hoặc

xenluloza. Ví dụ cụ thể về nguyên liệu này bao gồm sinh khối xenluloza như cỏ dại, chất thải nông nghiệp, giấy thải, hoặc nguyên liệu tương tự. Trước khi tiếp xúc với enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, tốt hơn nếu nguyên liệu chứa lignoxenluloza được xử lý cơ học, như cắt hoặc băm, xử lý hóa học bằng axit, kiềm, hoặc hợp chất tương tự, hoặc ngâm hoặc phân giải vào dung dịch đệm thích hợp.

Nói cách khác, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế có thể còn bao gồm bước xử lý cơ học, xử lý hóa học, hoặc ngâm hoặc phân giải nguyên liệu chứa lignoxenluloza vào dung dịch đệm thích hợp trước khi tiếp xúc với enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế

Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân hemixenluloza bởi β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế được thực hiện ở điều kiện mà ở đó enzym này có hoạt tính thủy phân xenlooligosacarit. Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân hemixenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0, tốt hơn nữa nếu phản ứng thủy phân hemixenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 90°C đến 110°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và còn tốt hơn nữa nếu phản ứng thủy phân hemixenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95°C đến 110°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0. Thời gian phản ứng thủy phân hemixenluloza được điều chỉnh thích hợp theo loại nguyên liệu được sử dụng, phương pháp xử lý sơ bộ nguyên liệu, lượng nguyên liệu, và các yếu tố tương tự. Ví dụ, phản ứng thủy phân hemixenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 10 phút đến 100 giờ, nhưng khi phân giải nguyên liệu chứa sinh khối xenluloza, thì phản ứng thủy phân hemixenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 1 giờ đến 100 giờ.

Để thủy phân nguyên liệu chứa lignoxenluloza, tốt hơn nữa nếu sử dụng ít nhất một glycosit hydrolaza khác ngoài β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế. Glycosit hydrolaza khác này có thể giống như glycosit hydrolaza chứa trong hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên, và tốt hơn nếu enzym này là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 85°C, và tốt hơn nếu ở nhiệt độ ít nhất nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 105°C, và còn tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C. Ngoài ra, theo một khía cạnh, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng

chế sử dụng β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, thể biến nạp theo sáng chế, hoặc β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế, trong khi đó theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza theo sáng chế sử dụng hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Quy trình tách dòng β -xylosidaza chịu nhiệt từ đất thu được ở khu vực suối nước nóng.

1. Chiết tách ADN từ đất thu được ở khu vực suối nước nóng và giải trình tự bộ gen

Để giải trình tự gen của β -xylosidaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C, ADN từ đất thu được ở khu vực suối nước nóng có độ pH từ trung tính đến kiềm yếu được thu nhận và ADN đa hệ gen của quần thể vi sinh vật trong đất này được giải trình tự.

Các mẫu đất ở khu vực suối nước nóng có độ pH từ trung tính đến kiềm yếu được lấy mẫu bằng cách thu thập các mẫu nước chứa đất, bùn và sinh khối được thu nhận từ 5 điểm lấy mẫu ở 3 khu vực suối nước nóng của Nhật Bản (các mẫu ADN đa hệ gen N2, AR19, AR15, OJ1, và H1). Các mẫu đất ở khu vực suối nước nóng này có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 58°C đến 78°C và độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 8 ở thời điểm lấy mẫu.

ADN được chiết tách từ 10g mỗi mẫu đất thu được ở các khu vực suối nước nóng bằng kit chiết tách ADN (ISOIL Large for Beads ver. 2, do Nippon Gene Co., Ltd. sản xuất). ADN chiết tách được được giải trình tự bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 do Roche Diagnostics Ltd. sản xuất và máy giải trình tự GA2x do Illumina, Inc. sản xuất. ADN chiết tách được (5µg) và sản phẩm khuếch đại (5µg) được tạo ra bằng kit khuếch

đại ADN bộ gen (kit khuếch đại ADN GenomiPhi V2, do GE Healthcare Inc. sản xuất) được giải trình tự tương ứng bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 và máy giải trình tự GA2x. Khi giải trình tự bằng máy giải trình tự GA2x, thì thư viện ADN và các chất phản ứng được đổ vào công đo dòng chảy bằng hệ thống cBot do Illumina, Inc. sản xuất để tự động tạo ra cụm gen có trình tự giống hệt với phân tử ADN duy nhất trong công đo dòng chảy. Các đầu bắt cặp có chiều dài bằng 101bp được giải trình tự bằng máy giải trình tự GA2x để thu được dữ liệu trình tự đa hệ gen.

Quá trình giải trình tự ADN đa hệ gen của mẫu đất suối nước nóng OJ1 (sau đây gọi tắt là đa hệ gen OJ1) bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 đã thu được trình tự bộ gen có chiều dài đoạn đọc trung bình bằng 390bp, tổng số các đoạn trình tự đọc bằng 6.301.450, và tổng chiều dài bộ gen đã được giải trình tự bằng 2.456.206.434bp và bằng máy giải trình tự GA2x đã thu được trình tự bộ gen có chiều dài đoạn trình tự đọc trung bình bằng 114bp ở các đoạn trình tự đọc có đầu bắt cặp, tổng số các đoạn trình tự đọc bằng 545.185.016, và tổng chiều dài bộ gen đã được giải trình tự bằng 62.151.091.824bp, tức là tổng cộng chiều dài bộ gen đã được giải trình tự bằng khoảng 64.6Gbp.

2. Quá trình lắp ráp và thống kê dữ liệu đa hệ gen của mẫu đất thu được ở khu vực suối nước nóng.

Các trình tự nucleotit thu được bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 và máy giải trình tự GA2x được sàng lọc chất lượng và lắp ráp lại một lần nữa bằng phần mềm CLC Genomics Workbench (phiên bản 5.4.8) do CLC bio A/S sản xuất. Sau khi sàng lọc chất lượng, tổng chiều dài đoạn trình tự đọc bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 bằng 2.446.280.452bp, và tổng chiều dài đoạn trình tự đọc của dữ liệu trình tự nucleotit thu được bằng máy giải trình tự GA2x bằng 54.066.191.005bp. Sau khi lắp ráp, tổng số lượng các đoạn tiếp giáp có chiều dài bằng 500bp hoặc lớn hơn bằng 2.080.555, và tổng chiều dài bằng 1.083.520.858bp và đoạn tiếp giáp lớn nhất có chiều dài bằng 1.063.869bp.

3. Quá trình phát hiện khung đọc mã mở (Open Reading Frame - ORF) của β -xylosidaza.

Các trình tự có mã phân loại enzym 3.2.1.4 (xenlulaza), 3.2.1.21 (β -glucosidaza), 3.2.1.37 (β -xylosidaza), 3.2.1.91 (xenluloza 1,4- β -xenlobiosidaza), và 3.2.1.8 (endo 1,4-

β -xylanaza) được tải về từ cơ sở dữ liệu UniProt (<http://www.uniprot.org/>, ngày truy cập: 09/12/2011), và cơ sở dữ liệu về các gen glycosit hydrolaza này được thiết kế. Khung đọc mã mở (các vùng gen) được phát hiện từ các trình tự tiếp giáp thu được ở phần 2 bằng phần mềm Metagene (Noguchi *et al.*, *DNA Research*, **2008**, 15(6)) (tùy chọn Metagene: -m). Gen mã hóa glycosit hydrolaza được xác định từ trình tự ORF phát hiện được bằng phần mềm BLASTP (phiên bản 2.2.18) và đối chiếu cơ sở dữ liệu nêu trên. Điều kiện tùy chọn của phần mềm BLASTP được cài đặt như sau: “trình tự truy vấn = sai”, “trị số kỳ vọng (E) < $1e^{-20}$ ”, (sau đó, các trị số mặc định được cài đặt như sau: “trị số để phát hiện khoảng trống = -1”, “trị số để mở rộng khoảng trống = -1”, “trị số sắp thẳng hàng được tạo khoảng trống X = 0”, “trị số lý thuyết cho các trình tự mục đích mở rộng = 0” và “cỡ chữ = mặc định”), và các trình tự khung đọc mã mở mục đích thu được là gen mã hóa glycosit hydrolaza. Các trình tự nucleotit thu được bao gồm các gen mã hóa glycosit hydrolaza như xenlulaza, endohemixenlulaza, và các enzym cắt mạch nhánh.

4. Quá trình phân loại các gen thành các họ glycosit hydrolaza.

Các trình tự nucleotit thu được ở phần 3 được phân loại chức năng bằng phần mềm pfam HMMs (Pfam phiên bản 23.0 và HMMER phiên bản 2.3 Finn *et al.*, *Nucleic Acids Research Database*, 2010, Issue 38, p.D211-222) dưới dạng cơ sở dữ liệu về trình tự vùng chức năng của protein. Cụ thể, mỗi trình tự nucleotit này được phân loại thành họ glycosit hydrolaza (GH) dựa trên độ tương đồng của chúng với cơ sở dữ liệu vùng Pfam bằng thuật toán tra cứu độ tương đồng trình tự HMMER (Durbin *et al.*, “*The theory behind profile HMMs. Biological sequence analysis: probabilistic models of protein and nucleic acids*”, 1998, Cambridge University Press.; hmmpfam (phiên bản 2.3.2), trị số kỳ vọng $E < 1e^{-5}$; cơ sở dữ liệu = Pfam_fs (mô hình có thể được sử dụng để phát hiện các đoạn của các vùng đại diện ở trình tự)). Các biến thể chứa 70% trình tự của vùng xúc tác GH hoặc cao hơn được tính là các gen mã hóa enzym thuộc các họ tương ứng.

Dựa trên kết quả tra cứu độ tương đồng BLASTP và tra cứu vùng HMMER bằng cách sử dụng dữ liệu trình tự đa hệ gen OJ1, 478 khung đọc mã mở (331 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ và 147 khung đọc mã mở có chiều dài không đầy đủ) được xác định là gen β -glucosidaza hoặc β -xylosidaza

Kết quả phân loại họ GH của các khung đọc mã mở này được thể hiện trong Bảng

1. Các khung đọc mã mở chứa 70% trình tự của vùng xúc tác GH hoặc cao hơn được phân loại thành mỗi họ GH tương ứng. Như được thể hiện trong Bảng 1, từ đa hệ gen OJ1 đã thu được 46 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH1, 197 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH3, 1 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH16, 1 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH26, 37 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH31, 1 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH39, 47 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH43 và 13 khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ thuộc họ GH52.

Bảng 1

Đa hệ gen OJ1	Phân loại họ GH của các gen β -glucosidaza hoặc β -xylosidaza								
	GH1	GH3	GH16	GH26	GH31	GH39	GH43	GH52	Tổng số
Khung đọc mã mở có chiều dài đầy đủ	46	197	1	1	37	1	47	1	331
Khung đọc mã mở có chiều dài không đầy đủ	4	118	0	0	11	0	14	0	147
Tổng số khung đọc mã mở	50	315	1	1	48	1	61	1	478

5. Tách dòng gen từ khung đọc mã mở OJ1M-273

Các đoạn môi được thiết kế cho toàn bộ các khung đọc mã mở đã được xác định là gen β -glucosidaza hoặc gen β -xylosidaza, và các gen này được khuếch đại từ ADN đa hệ gen thu được từ đất ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp PCR. Các sản phẩm PCR đã được khuếch đại được chèn vào vectơ pET101/D-TOPO bằng kit biểu hiện Champion pET Directional TOPO (do Life Technologies Inc. sản xuất), và biến nạp vào chủng One Shot TOP10. Các dòng đã biểu hiện được chọn lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc và nuôi cấy trong môi trường lỏng LB chứa ampicilin với nồng độ bằng 100mg/L ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 17 đến 20 giờ, tiếp theo các plasmid được tổng hợp bằng kit miniprep (hệ thống tinh chế ADN Wizard plus SV Minipreps, do Promega Corporation sản xuất). Các plasmid đã tổng hợp được giải trình tự bằng máy giải trình tự ADN 3730 do Life Technologies Corporation sản xuất.

Kết quả thu được 4 dòng gen OJ1M-273-1, OJ1M-273-3, OJ1M-273-12 và OJ1M-273-18 bằng phương pháp PCR từ khung đọc mã mở OJ1M-273 (SEQ ID NO.3) đã được xác định là khung đọc mã mở mã hóa gen β -glucosidaza hoặc gen β -xylosidaza. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.3) của khung đọc mã mở OJ1M-273 có chiều dài bằng 2.178bp, nhưng do trình tự đầu bắt cặp của máy giải trình tự GA2x được sử dụng, nên trình tự này

còn chứa cả các trình tự chưa biết (“đoạn trình tự n” trên SEQ ID NO.3, và “đoạn trình tự Xaa” trên SEQ ID NO.1), và trình tự nucleotit thực tế (SEQ ID NO.4) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 thu được có chiều dài bằng 2.247 bp.

Fig.1A và Fig.1B là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự nucleotit của khung đọc mã mở OJ1M-273 (SEQ ID NO.3) và gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 (SEQ ID NO.4). Fig.2 là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin (SEQ ID NO.1) của khung đọc mã mở OJ1M-273 và trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1. Trên Fig.1A, Fig.1B và Fig.2, các chữ cái màu trắng trên nền đen thể hiện các đoạn trình tự ở đó nucleotit hoặc axit amin khác nhau, hoặc các đoạn trình tự chưa biết trong khung đọc mã mở.

Gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 mã hóa polypeptit (SEQ ID NO.2) chứa 748 gốc axit amin và có chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO.4), trong đó polypeptit này bắt đầu từ gốc axit amin metionin ở vị trí số 1, và đầu 3' của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit này được kết thúc bằng bộ ba mã hóa kết thúc. Kết quả phân tích độ tương đồng trình tự cho thấy đoạn peptit chứa 406 gốc axit amin từ metionin (M) ở vị trí số 12 đến leucin (L) ở vị trí số 417 mã hóa bởi gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 là vùng xúc tác của glycosit hydrolaza GH3. Kết quả phân tích bằng phần mềm dự đoán trình tự tín hiệu SignalP 4.1 cho thấy trình tự axit amin mã hóa bởi gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 không chứa peptit tín hiệu. Dòng gen này là trình tự thể hệ mới, trong đó trình tự axit amin mã hóa bởi dòng gen này có độ tương đồng bằng 65% và 62% so với vùng xúc tác GH3 và trình tự có chiều dài đầy đủ tương ứng của β -xylosidaza có nguồn gốc từ *Candidatus Caldatribacterium californiense* (Mã truy cập Ngân hàng Gen: WP_026140775.1) (SEQ ID NO.9). Độ tương đồng trình tự được xác định bằng phần mềm thuật toán ClustalW.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 và trình tự axit amin (SEQ ID NO.9) của β -xylosidaza có nguồn gốc từ *Candidatus Caldatribacterium californiense*. Trên Fig.3, các axit amin màu trắng trên nền đen là các gốc axit amin giống hệt nhau trong cả hai trình tự axit amin này, và các gốc axit amin màu đen trên nền xám thể hiện các vị trí ở đó các gốc axit amin trên các trình tự này là gần giống nhau và ký tự “-” thể hiện các đoạn khoảng

trồng trên trình tự.

6. Quá trình biểu hiện và tinh chế protein enzyme β -xylosidaza.

Sau khi giải trình tự, các plasmit chứa gen đích được biến nạp vào *E. coli* để biểu hiện protein bằng phương pháp sốc nhiệt. Chủng BL21 Star (DE3) có sẵn trong kit biểu hiện Champion pET Directional TOPO (do Life Technologies Inc. sản xuất) được sử dụng làm tế bào chủ để chuyển gen. *E. coli* chứa gen đích được cấy vào môi trường LB chứa ampicilin với hàm lượng bằng 100mg/L và nuôi cấy cho đến khi mật độ quang ở bước sóng 600nm nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,8, sau đó IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranosit) được bổ sung vào, và nuôi cấy tiếp trong 5 đến 20 giờ để cảm ứng quá trình biểu hiện protein đích. Kết quả là protein enzyme mã hóa bởi gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 đã được biểu hiện yếu.

Để làm tăng mức độ biểu hiện của protein enzyme này, gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 được chèn vào vector biểu hiện pLEAD (do Nippon Gene Co., Ltd. sản xuất) và biến nạp vào chủng JM109. Vector biểu hiện pLEAD đã được kiểm chứng là có thể biểu hiện hiệu quả gen có hàm lượng GC cao mà khó biểu hiện được bằng vector biểu hiện *E. coli* thông thường (Suzuki et al., J. Biochem., 1997, vol. 121, pp. 1031 to 1034; and Ishida and Oshima, J. Biochem., 2002, vol. 132., pp. 63-70). Kết quả phân tích đã kiểm chứng được rằng protein enzyme mã hóa bởi gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1 đã được biểu hiện mạnh.

Cụ thể, sử dụng khuôn là vector pET101/D-TOPO chứa gen tiềm năng β -xylosidaza OJ1M-273-1, đoạn môi xuôi có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.7 (5'-GTGATGTCGGTTCGGGTGAAGGAA-3': trong đó 3 nucleotit (GTG) được bổ sung vào đầu 5' của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.5, và đầu 5' này được phosphoryl hóa), và đoạn môi ngược có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO. 8 (5'-TAGAGCTCTCATGCGGGCTCAACTTCAA-3': trong đó trình tự để nhận biết enzyme cắt giới hạn SacI được bổ sung vào đầu 5' của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.6, trình tự SacI được dùng để chèn vector), sản phẩm PCR đã được khuếch đại bằng kit KOD-Plus-Neo (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được chèn vào vector pLEAD5, và biến nạp vào chủng *E. coli* JM109. Các dòng đã biểu hiện được chọn lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc và nuôi cấy trong môi trường lỏng LB

chứa ampicilin với nồng độ bằng 50mg/L ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 17 đến 20 giờ, tiếp theo các plasmid được tổng hợp bằng kit miniprep (hệ thống tinh chế ADN Wizard plus SV Minipreps, do Promega Corporation sản xuất). Các plasmid đã tổng hợp được giải trình tự bằng máy giải trình tự ADN 3730 do Life Technologies Corporation sản xuất.

Chủng *E. coli* đã chuyển gen chứa trình tự plasmid OJ1M-273-1/pLEAD5 đã được kiểm chứng được cấy vào môi trường canh thanh Turbo (do Athena Environmental Sciences, Inc. sản xuất) chứa ampicilin với nồng độ bằng 50mg/L, và nuôi cấy trong khoảng 20 giờ để biểu hiện protein đích. Sau khi nuôi cấy, chủng *E. coli* này được thu nhận bằng cách ly tâm, và dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) có thể tích bằng 1/10 thể tích dịch nuôi cấy được bổ sung vào để tạo hỗn dịch vi khuẩn. Sau đó, quy trình phân cắt trong 5 phút và để yên trong 5 phút được lặp lại từ 7 đến 8 lần bằng thiết bị siêu âm Astrason 3000 (do MISONIX, Inc. sản xuất) để thu được dịch chiết thô *E. coli* tái tổ hợp gen chứa protein đích. Dịch chiết thô *E. coli* tái tổ hợp gen này được lọc qua màng lọc (đường kính lỗ lọc $\phi = 0,45\mu\text{m}$, do EMD Millipore sản xuất), và dịch lọc thu được được sử dụng làm dịch nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen.

Dịch nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen được nạp vào cột trao đổi ion HiTrap Q HP (do GE Healthcare Inc. sản xuất) được làm cân bằng với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), và các protein được phân đoạn với gradient nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 50% trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 1M NaCl bằng hệ thống sắc ký lỏng AKTA (do GE Healthcare Inc. sản xuất). Các phân đoạn có hoạt tính β -xylosidaza được trộn toàn bộ, sau đó trao đổi với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 750mM amoni sulfat bằng màng siêu lọc ly tâm VIVASPIN 20 (do Sartorius stedim Biotech SA sản xuất). Các phân đoạn có hoạt tính β -xylosidaza sau khi trao đổi với dung dịch đệm được nạp vào cột phân tách tương tác kỵ nước HiTrap Phenyl HP (do GE Healthcare Inc. sản xuất) được làm cân bằng với cùng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), và các protein được phân đoạn với gradient nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 100% trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0). Các phân đoạn có hoạt tính β -xylosidaza được trộn toàn bộ, sau đó cô bằng màng siêu lọc ly tâm VIVASPIN 20 cho đến khi thể tích dung dịch bằng khoảng 8mL. Mẫu đã cô được bổ sung vào cột lọc gel Hiload 26/60 superdex 200 pg (do GE

Healthcare Inc. sản xuất) được làm cân bằng với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 150mM NaCl, và phân đoạn bằng cùng dung dịch đệm có thể tích gấp 1 đến 1,5 lần thể thích của cột ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 2mL/phút đến 3mL/phút. Các phân đoạn có hoạt tính β -xylosidaza được trộn toàn bộ, sau đó trao đổi với dung dịch đệm phosphat 1mM (độ pH = 6,8) và cô bằng màng siêu lọc ly tâm VIVASPIN 20, mẫu đã cô được nạp vào cột hydroapatit CHT5-1 (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) được làm cân bằng với cùng dung dịch đệm, và các protein được phân đoạn với gradient nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 100% trong dung dịch đệm axit phosphat 400mM (độ pH = 6,8). Các phân đoạn có hoạt tính β -xylosidaza được trộn toàn bộ một lần nữa, sau đó trao đổi với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) và cô để thu được enzym tinh khiết có nồng độ cuối cùng bằng khoảng 1,0mg/mL.

Dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen và enzym tinh khiết này (protein enzym β -xylosidaza tinh khiết) được kiểm chứng bằng phân tích điện di trên gel SDS-PAGE (gel SDS-polyacrylamit). Dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen và enzym tinh khiết này được phân tích điện di SDS-PAGE bằng gel không chứa thuốc nhuộm PROTEAN TGX (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất). Dịch nổi nuôi cấy và enzym tinh khiết này lần lượt được trộn với dung dịch xử lý Tris-SDS β ME (do Cosmo Bio Co. Ltd. sản xuất) theo tỷ lệ 1:1, và sau khi xử lý các mẫu điện di thu được này ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút, dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen (10 μ L) và enzym tinh khiết (2 μ g) được điện di tương ứng. Sau khi chạy điện di, các băng protein được hiện màu bằng thuốc nhuộm CBB.

Fig.4 thể hiện kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE của dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen thu được từ *E. coli* đã chuyển gen OJ1M-273-1 và enzym tinh khiết được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen này. Như được thể hiện bằng hình ảnh điện di trên Fig.4, làn 1 là gen chỉ thị phân tử protein, làn 2 thể hiện hình ảnh điện di của dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen và làn 3 thể hiện hình ảnh điện di của enzym tinh khiết. Kết quả phân tích cho thấy trong dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen (làn 2) có một băng đậm có trọng lượng phân tử gần bằng 78,9kDa là trọng lượng phân tử của polypeptit được xác định từ trình tự axit amin (SEQ ID NO.2), và trong enzym tinh khiết (làn 3) có một băng duy nhất tương đương với băng nêu trên (được thể hiện bằng mũi tên trên Fig.4).

7. Đo hoạt tính β -xylosidaza bằng cơ chất PNPX (hoạt tính thủy phân PNPX)

PNPX được sử dụng làm cơ chất để đo hoạt tính β -xylosidaza. Dung dịch cơ chất được điều chế bằng cách hòa tan PNPX (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất) trong nước để thu được nồng độ cuối cùng định trước. Dung dịch nước PNPX được điều chế bằng phương pháp nêu trên được sử dụng làm dung dịch cơ chất PNPX trong toàn bộ các thử nghiệm sau. Trong phép đo này, dung dịch được điều chế bằng cách pha loãng enzym tinh khiết thu được ở phần 6 bằng dung dịch đệm Tris-HCl 0,05M (độ pH = 8,0) để thu được nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,01 mg/mL được sử dụng.

Dung dịch phản ứng chứa 6 μ L enzym tinh khiết đã pha loãng, 294 μ L nước tinh khiết, 150 μ L dung dịch đệm acetat 200mM (độ pH = 5), và 150 μ L dung dịch nước PNPX 20mM.

Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 115°C trong 10 phút bằng thiết bị Reacti-Therm (do Thermo Fisher Scientific Inc. sản xuất). Bình thủy tinh có dung tích 1,5mL được sử dụng làm bình phản ứng, và bình phản ứng này được tráng qua bằng dung dịch nước chứa 1,5% khối lượng BSA để ức chế hấp thụ protein enzym. Trong toàn bộ các phép đo, dung dịch hỗn hợp được điều chế bằng cách thay dịch nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen hoặc enzym tinh khiết bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), sau đó để phản ứng ở cùng điều kiện được sử dụng làm mẫu đối chứng. Hơn nữa, dung dịch hỗn hợp chứa enzym (dịch nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen hoặc enzym tinh khiết), nước tinh khiết và dung dịch đệm này được giữ ở nhiệt độ phản ứng trong 5 phút, (ủ sơ bộ), sau đó dung dịch cơ chất được bổ sung vào, và thực hiện phản ứng. Trong mỗi trường hợp, sau khi để phản ứng trong 10 phút, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch Na₂CO₃ 0,2M vào dung dịch phản ứng ở thể tích bằng thể tích của dung dịch hỗn hợp này, sau đó hỗn hợp thu được được ly tâm trong 5 phút để thu được phần dịch nổi. Hàm lượng p-nitrophenol trong phần dịch nổi được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 420nm bằng máy quang phổ, và hàm lượng p-nitrophenol trong phần dịch nổi được đo bằng đường chuẩn p-nitrophenol, sau đó hàm lượng p-nitrophenol tạo ra bởi quá trình thủy phân được đo bằng cách so sánh độ chênh lệch với mẫu đối chứng. Hoạt tính enzym để tạo ra 1 μ mol p-nitrophenol trong 1 phút được tính bằng 1U, và trị số thu được bằng cách chia hoạt tính

này cho khối lượng protein được tính bằng hoạt tính riêng (U/mg). Mỗi phép đo được lặp lại 3 lần để thu được trị số trung bình và độ lệch chuẩn.

Kết quả đo cho thấy cả dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E. coli* tái tổ hợp gen lần enzym tinh khiết đều có hoạt tính β -xylosidaza (hoạt tính thủy phân PNPX).

8. Độ đặc hiệu cơ chất của OJ1M-273-1

Hoạt tính thủy phân các cơ chất xenluloza và hemixenluloza khác nhau của protein enzym (OJ1M-273-1) mã hóa bởi gen OJ1M-273-1 được đo. CMC (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), xylan (có nguồn gốc từ gỗ sồi, do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), arabinan (có nguồn gốc từ củ cải đường, do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), arabinogalactan (có nguồn gốc từ gỗ thông rụng lá, do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPX (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPG (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPAF (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPAP (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPGA (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPPF (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPRP (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPMP (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất), PNPdX (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất) và PNPbDFP (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất) được sử dụng làm các cơ chất.

Đặc biệt, khi cơ chất được sử dụng không phải là CMC, xylan, arabinan và arabinogalactan, thì chỉ khác là sử dụng enzym tinh khiết được pha loãng đến nồng độ 0,02mg/mL và dung dịch nước chứa 20mM mỗi cơ chất, và thực hiện các phản ứng ở nhiệt độ 105°C, và phương pháp tương tự được mô tả trong phần 7 vẫn được sử dụng để xác định hàm lượng p-nitrophenol được tạo ra bởi quá trình thủy phân bằng enzym, sau đó xác định hoạt tính riêng (U/mg).

Khi cơ chất được sử dụng là CMC, xylan, arabinan hoặc arabinogalactan, thì chỉ khác là sử dụng enzym tinh khiết được pha loãng đến nồng độ 0,02mg/mL và dung dịch nước chứa 1% khối lượng mỗi cơ chất, và thực hiện các phản ứng ở nhiệt độ 105°C, trước tiên phản ứng được thực hiện theo cùng cách thức được mô tả trong phần 7, và sau khi kết thúc phản ứng axit 3,5-đinitrosalicylic (dung dịch DNS) được bổ sung vào dung dịch phản ứng ở thể tích bằng thể tích của dung dịch phản ứng, và hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 5 phút, làm nguội trên nước đá trong 5 phút, sau đó ly

tâm ở tốc độ 17.500g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu được phần dịch nổi. Hàm lượng đường khử trong phần dịch nổi được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ, và hàm lượng đường khử trong phần dịch nổi được đo bằng đường chuẩn glucoza (đặc biệt, khi xylan được sử dụng làm cơ chất, thì hàm lượng đường khử trong phần dịch nổi được đo bằng đường chuẩn xyloza, hoặc khi arabinan hoặc arabinogalactan được sử dụng làm cơ chất, thì hàm lượng đường khử trong phần dịch nổi được đo bằng đường chuẩn arabinosa), sau đó hàm lượng đường khử tạo ra bởi quá trình thủy phân bằng enzym được đo bằng cách so sánh độ chênh lệch với mẫu đối chứng. Hoạt tính enzym để tạo ra 1 μ mol đường khử trong 1 phút được tính bằng 1U, và trị số thu được bằng cách chia hoạt tính này cho khối lượng protein được tính bằng hoạt tính riêng (U/mg).

Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.5. Mỗi trị số hoạt tính enzym được tính theo hoạt tính tương đối (%) với quy ước rằng hoạt tính thủy phân PNPX bằng 100%. Các kết quả này cho thấy OJ1M-273-1 có hoạt tính thủy phân mạnh PNPX, PNPAF, PNPAP, arabinan và arabinogalactan, có hoạt tính thủy phân yếu PNPG và xylan, và hầu như không có hoạt tính thủy phân các cơ chất còn lại.

9. Động học phản ứng enzym của β -xylosidaza OJ1M-273-1

Tốc độ thủy phân ban đầu cực đại ($V_{\text{cực đại}}$), hằng số Michaelis (K_m) và hiệu suất xúc tác (K_{cat}/K_m) đối với cơ chất PNP của enzym OJ1M-273-1 được đo, chỉ khác là sử dụng dung dịch nước PNPX có nồng độ bằng 0,2mM, 0,5mM, 1mM, 3mM, 5mM, 10mM và 20mM, dung dịch nước PNPAF và dung dịch nước PNPAP đều có nồng độ bằng 1mM, 3mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM và 60mM, enzym đã được pha loãng đến nồng độ bằng 0,01mg/mL, và thực hiện các phản ứng ở nhiệt độ 105°C, các thông số động học phản ứng enzym của β -xylosidaza OJ1M-273-1 được đo theo cùng cách thức như mô tả trong phần 7, và hoạt tính thủy phân cơ chất PNP (U/mg) được đo trong mỗi trường hợp. Tốc độ thủy phân ban đầu cực đại ($V_{\text{cực đại}}$) và hằng số Michaelis (K_m) được xác định theo mô hình Michaelis-Menten bằng phần mềm Origin (do LightStone Corporation sản xuất), và các trị số thu được được sử dụng để xác định hiệu suất xúc tác (K_{cat}/K_m).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2. Tốc độ thủy phân ban đầu cực đại là cao

nhất khi cơ chất PNPAF được sử dụng, nhưng hiệu suất xúc tác là cao nhất khi cơ chất PNPX được sử dụng. Điều này chứng tỏ rằng PNPX là cơ chất thích hợp nhất đối với OJ1M-273-1.

Bảng 2

	$V_{\text{cực đại}}$ (U/mg)	K_m (mM)	K_{cat}/K_m (mM ⁻¹ giây ⁻¹)
PNPX	86,0	0,44	259,8
PNPAF	914,5	13,7	87,7
PNPAP	838,5	20,6	53,6

10. Đánh giá mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ và độ pH của hoạt tính β -xylosidaza bằng cơ chất PNPX.

Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ và độ pH của hoạt tính thủy phân PNPX của protein enzym (OJ1M-273-1) mã hóa bởi gen OJ1M-273-1 được đánh giá. Trong phép đo này, dung dịch enzym tinh khiết (0,1mg/mL) được điều chế bằng cách pha loãng enzym tinh khiết thu được ở phần 6 được sử dụng.

Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ của hoạt tính thủy phân PNPX của enzym tinh khiết OJ1M-273-1 được đo theo cùng cách thức như nêu trong phần 7, chỉ khác là phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ bằng 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C, 110°C và 115°C, và ở mỗi nhiệt độ hàm lượng p-nitrophenol được tạo ra bằng quá trình thủy phân enzym, và hoạt tính thủy phân PNPX (U/mg) được đo.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.6. Các trị số hoạt tính enzym được tính theo hoạt tính tương đối (%), với quy ước rằng hoạt tính thủy phân mạnh nhất ở nhiệt độ 105°C bằng 100%. OJ1M-273-1 có hoạt tính thủy phân PNPX ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 110°C. Ở khoảng nhiệt độ này, hoạt tính thủy phân PNPX tăng khi nhiệt độ phản ứng enzym tăng, và nhiệt độ tối ưu ($T_{\text{tối ưu}}$) ở đó enzym có hoạt tính mạnh nhất là 105°C. Khi nhiệt độ phản ứng enzym tăng trên 105°C, thì hoạt tính thủy phân PNPX giảm nhanh.

Mức độ phụ thuộc vào độ pH của hoạt tính thủy phân PNPX của enzym tinh khiết OJ1M-273-1 được đo theo cùng cách thức như nêu trong phần 7, chỉ khác là sử dụng dung dịch hỗn hợp chứa enzym tinh khiết đã được pha loãng đến nồng độ bằng 0,1mg/mL và 150 μ L dung dịch đệm McIlvaine (độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 8) và

thực hiện phản ứng ở nhiệt độ 105°C, và ở mỗi độ pH, hàm lượng p-nitrophenol được tạo ra bằng quá trình thủy phân enzym, và hoạt tính thủy phân PNPX (U/mg) được đo.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.7. Các trị số hoạt tính enzym được tính theo hoạt tính tương đối (%), với quy ước rằng hoạt tính thủy phân mạnh nhất ở pH 5.0 bằng 100%. Các trị số đo thực của dung dịch hỗn hợp chứa cơ chất, dung dịch đệm, và enzym được vẽ đồ thị theo các trị số độ pH. OJ1M-273-1 có hoạt tính thủy phân PNPX ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7. Độ pH tối ưu bằng 5,14 (trị số đo thực của dung dịch hỗn hợp chứa cơ chất, dung dịch đệm, và enzym).

11. Đánh giá độ ổn định nhiệt của β -xylosidaza theo sáng chế

Độ ổn định nhiệt của hoạt tính thủy phân PNPX của OJ1M-273-1 được đánh giá. Các phép đo được thực hiện bằng dung dịch enzym tinh khiết được điều chế bằng cách pha loãng enzym tinh khiết thu được ở phần 6 đến nồng độ bằng 0,1 mg/mL

Cụ thể, dung dịch hỗn hợp chứa 6 μ L dung dịch enzym tinh khiết (0,1mg/mL), 294 μ L nước tinh khiết và 150 μ L dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH = 5,0) wđược giữ ở nhiệt độ 85°C, 90°C, 95°C, 100°C hoặc 105°C trong 0, 30, 60, 120 hoặc 240 phút (ủ sơ bộ), sau đó hoạt tính thủy phân được đo ở nhiệt độ 95°C theo cùng cách thức như nêu trong phần 7, hàm lượng p-nitrophenol được tạo ra bằng quá trình thủy phân enzym, và hoạt tính tương đối (U/mg) được đo.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.8. Các trị số hoạt tính enzym được tính theo hoạt tính tương đối (%), với quy ước rằng hoạt tính đối với mẫu không xử lý (thời gian giữ: 0 phút) bằng 100%. Thời gian giữ cần thiết để hoạt tính enzym của giảm 50% so với hoạt tính của mẫu không xử lý được xác định là thời gian bán giảm $T_{1/2}$. Trị số $T_{1/2}$ của OJ1M-273-1 bằng khoảng 240 phút khi nhiệt độ giữ bằng 85°C, about 180 phút khi nhiệt độ giữ bằng 90°C hoặc 95°C, và 130 phút khi nhiệt độ giữ bằng 100°C. Trái lại, khi nhiệt độ giữ bằng 105°C, thì hoạt tính thủy phân PNPX giảm nhanh, và giảm xuống còn khoảng 30% sau 30 phút.

450 455 460
 Val Gly Glu Gly Cys Asp Arg Val Asp Leu Arg Leu Pro Gly His Gln
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Val Lys Ala Val Val Glu Thr Gly Lys Pro Val Val Leu
 485 490 495
 Val Leu Ile Asn Gly Arg Pro Val Thr Leu Gly Glu Leu Val Asp Lys
 500 505 510
 Ile Pro Ala Ile Val Glu Ala Trp Phe Pro Gly Glu Glu Gly Gly Asn
 515 520 525
 Ala Val Ala Asp Val Leu Phe Gly Asp Val Asn Pro Gly Gly Lys Leu
 530 535 540
 Pro Ile Thr Phe Pro Lys Val Val Gly Gln Val Pro Leu His Tyr Ser
 545 550 555 560
 Arg Ala Pro Leu Ser His Arg Asp Tyr Val Glu Met Lys Asn Val Pro
 565 570 575
 Gln Phe Pro Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr Lys Phe Glu Tyr Ser
 580 585 590
 Asp Leu Thr Ile Ala Pro Glu Lys Ile Ser Pro Ala Gly Thr Val Ser
 595 600 605
 Ile Ser Val Thr Val Lys Asn Val Gly Asp Arg Glu Gly Asp Glu Val
 610 615 620
 Val Gln Leu Tyr Val Arg Asp Val Val Ala Ser Arg Val Arg Pro Val
 625 630 635 640
 Lys Glu Leu Lys Gly Phe Lys Arg Val Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ala
 645 650 655
 Lys Arg Val Thr Phe His Leu Ser Ala Asp Gln Leu Ala Phe Tyr Asp
 660 665 670
 Arg Ala Met Arg Phe Val Val Glu Pro Gly Thr Ile Glu Val Met Val
 675 680 685
 Gly Ser Ser Ser Glu Asp Ile Arg Leu Thr Gly Lys Phe Glu Ile Val
 690 695 700
 Gly Asp Val Arg Glu Val Pro Gly Glu Arg Val Met Phe Thr Arg Val
 705 710 715 720
 Glu Val Glu Pro Ala
 725
 <210> 2
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> OJ1M-273-1
 <400> 2
 Met Ser Val Arg Val Lys Glu Leu Leu Ala Lys Met Thr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Ser Val His Arg Leu Met Thr Asp
 20 25 30
 Gly Lys Phe Asp Ile Ala Lys Ala Arg Glu Leu Leu Lys His Gly Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Thr Arg Val Ala Gly Gly Ser Asp Leu Pro Pro Lys Glu
 50 55 60
 Ala Ala Gln Leu Ala Asn Glu Ile Gln Arg Phe Leu Ile Glu Glu Thr
 65 70 75 80
 Arg Leu Gly Ile Pro Ala Ile Val His Glu Glu Cys Leu Ser Gly Leu
 85 90 95
 Met Ala Arg Gly Ser Thr Thr Phe Pro Gln Ala Ile Asn Leu Ala Ser
 100 105 110
 Thr Phe Asp Pro Asp Leu Val Arg Glu Met Thr Thr Val Ile Arg Lys
 115 120 125
 Glu Met Arg Ala Val Gly Ala His Gln Gly Leu Ser Pro Val Leu Asp
 130 135 140
 Val Leu Arg Asp Pro Arg Trp Gly Arg Thr Glu Glu Thr Phe Gly Glu
 145 150 155 160
 Asp Pro Tyr Leu Ile Ala Cys Met Ala Val Ala Tyr Ile Ser Gly Leu
 165 170 175
 Gln Gly Glu Asp Leu Arg Gln Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Phe
 180 185 190
 Ser Gly His Gly Trp Pro Glu Gly Gly Arg Asn Cys Ala Pro Leu His
 195 200 205
 Val Gly Pro Arg Glu Phe Arg Glu Val Leu Ser Phe Pro Phe Glu Ala
 210 215 220
 Ala Val Arg Val Ala Arg Val Gln Ser Val Met Asn Ala Tyr His Asp
 225 230 235 240
 Ile Asp Gly Ile Pro Cys Ala Ala Ser Arg Glu Leu Leu Thr Asp Leu
 245 250 255
 Leu Arg Gly Glu Trp Gly Phe Asp Gly Ile Val Val Ser Asp Tyr Ala
 260 265 270
 Ala Val His Met Leu Phe Asn Val His Arg Val Ala Val Asp Glu Lys
 275 280 285
 Asp Ala Ala Cys Gln Ala Leu Tyr Ala Gly Ile Asp Ile Glu Leu Pro

290 295 300
 Asp Leu Asn Cys Tyr Ala Lys Leu Ile Asp Ala Val Arg Glu Gly Leu
 305 310 315 320
 Ile Ser Glu Ala Ile Val Asp Glu Ala Val Arg Val Leu Thr Val
 325 330 335
 Lys Glu Arg Leu Gly Leu Phe Asp Asn Pro Pro Phe Val Asp Pro Glu
 340 345 350
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Asp Ala Pro Glu His Arg Gln Leu Ala Arg
 355 360 365
 Leu Leu Ala Gln Lys Ser Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Asn Leu
 370 375 380
 Leu Pro Leu Arg Lys Asp Leu Ser Gly Ile Ala Val Ile Gly Pro Asn
 385 390 395 400
 Ala Asp Asp Pro Arg Asn Met Leu Gly Asp Tyr Ala Tyr Val Ala His
 405 410 415
 Leu Asp Leu Lys Glu Thr Pro Val Pro Ile Val Thr Val Leu Glu Gly
 420 425 430
 Ile Lys Ala Lys Val Ser Pro Ala Thr Lys Val Leu Tyr Ala Lys Gly
 435 440 445
 Cys Glu Val Leu Asp Gly Thr Thr Glu Gly Ile Ala Glu Ala Val Glu
 450 455 460
 Val Ala Lys Gln Ala Glu Val Val Val Leu Val Val Gly Asp Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Leu Phe Gly Lys Gly Thr Val Gly Glu Gly Cys Asp Arg Val Asp
 485 490 495
 Leu Arg Leu Pro Gly His Gln Glu Glu Leu Val Lys Ala Val Val Glu
 500 505 510
 Thr Gly Lys Pro Val Val Leu Val Leu Ile Asn Gly Arg Pro Val Thr
 515 520 525
 Leu Gly Glu Leu Val Asp Lys Ile Pro Ala Ile Val Glu Ala Trp Phe
 530 535 540
 Pro Gly Glu Glu Gly Gly Asn Ala Val Ala Asp Val Leu Phe Gly Asp
 545 550 555 560
 Val Asn Pro Gly Gly Lys Leu Pro Ile Thr Phe Pro Lys Val Val Gly
 565 570 575
 Gln Val Pro Leu His Tyr Ser Arg Ala Pro Leu Ser His Arg Asp Tyr
 580 585 590
 Val Glu Met Lys Asn Val Pro Gln Phe Pro Phe Gly His Gly Leu Ser
 595 600 605
 Tyr Thr Lys Phe Glu Tyr Ser Asp Leu Thr Ile Ala Pro Glu Lys Ile
 610 615 620
 Ser Pro Ala Gly Thr Val Ser Ile Ser Val Thr Val Lys Asn Val Gly
 625 630 635 640
 Asp Arg Glu Gly Asp Glu Val Val Gln Leu Tyr Val Arg Asp Val Val
 645 650 655
 Ala Ser Arg Val Arg Pro Val Lys Glu Leu Lys Gly Phe Lys Arg Val
 660 665 670
 Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ala Lys Arg Val Thr Phe His Leu Ser Ala
 675 680 685
 Asp Gln Leu Ala Phe Tyr Asp Arg Ala Met Arg Phe Val Val Glu Pro
 690 695 700
 Gly Thr Ile Glu Val Met Val Gly Ser Ser Ser Glu Asp Ile Arg Leu
 705 710 715 720
 Thr Gly Lys Phe Glu Ile Val Gly Asp Val Arg Glu Val Pro Gly Glu
 725 730 735
 Arg Val Met Phe Thr Gln Val Glu Val Glu Pro Ala
 740 745

<210> 3

<211> 2178

<212> ADN

<213> Trình tự chưa biết

<220>

<223> Khung đọc mã mở OJ1M-273

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (900)..(954)

<223> Đoạn trình tự axit nucleic "n" chưa biết

<400> 3

atgtcgggttc gggatgaagga actttttggcg aagatgaccc ttgaggagaa agttgcccac 60
 ctgtgttcaa ttctgtcca caggctcatg accgacggca aatttgacat tgcaaaggct 120
 cgtgagattgc tcaagcatgg catcgggtcaa atcaccggcg tcgctggcgg cagcaattta 180
 ccgcccagg aagcagcaca actcgccaac gaaattcagc gcttctctcat tgaagagacg 240
 aggttgggaa ttcccgctat cgtgcacgaa gaatgcctca gcggattgat ggccgagagg 300
 tcaacgactt tccccaaagc catcaacttg gcaagcactt ttgaccccga tttggttcgg 360
 gagatgacaa cggttaattcg caaggaaatg cgcgccgtcg gagegcatca aggtttgtcg 420
 cctgtcttgg atgtccttcg cgaccgcgga tggggacgga cggaagaaac tttcggcgaa 480
 gaccatact tgattgctg catggcggtc gcttacatct ctggcttgca aggcgaagat 540
 ttgaggcagg gcgtcattgc taccgcaaag cacttttcag gtcacgggtt gcctgaaggc 600
 ggtcgtaact gtgcccact tcatgtcggg ccgagagagt tcagggaagt cctctcattc 660

```

ccctttgaag cggcagttag ggtggcaaga gttcagtcgg tcatgaacgc ttacatgac 720
attgatggca tcccttgccg tgcttcccgc gaggttgtga ctgaccttct gcgaggcgaa 780
tggggatttg acggcatcgt cgtttcagat tacgccgccc tccacatgct tttcaatgtc 840
cacagggttg cagttgacga aaaagatgca gcctgccaa cccctttatgc aggcattgan 900
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnttgttt 960
gacaatccgc cgttcggtga ccccgaaagc gcaccttcgc tttttgacgc cctgaacac 1020
cgccaactcg ctcggttgct cgtcctaaaag tcaattgtgt tgctcaaaaa cgatggtaac 1080
ttgcttccgc tacgaaaaga tttgtcaagc atcgccgtca tcgggtccaaa cgccgacgac 1140
ccacgaaaca tgctcggcga ttacgcttat gtggtcact tggacttgaa ggaaacgcct 1200
gtgccaattg tgactgtcct tgaaggcatc aaggcgaaag tttcgccgc cagaaaagtc 1260
ctctacgcc aaggttgcca agttctggac gggacaacgc aaggaatgc cgaagcggtt 1320
gaagtcgcaa aacaagcgga agtcgtcgtc ttggtcgctg gtgaccgctc aggcctgttc 1380
ggcaaaggga cggtcggcga aggttgcat aggttgact tgaggcttc cggtcaccaa 1440
gaggaaactg tcaaggctgt ggttgaaact ggcaagccgc tcgtcttggt tctcatcaac 1500
ggtcgccccg ttacgcttgga agaactcgtt gacaaaattc cggcaatagt tgaggcttg 1560
tttcgggttg aggaaggttg caatgctgtc gctgatgttt tgtttgcgga tgtcaaccca 1620
ggcgcgaaac tccccatcac ctccccgaaa gtcgtcggtc aagtcgcgt gactatagc 1680
cgagcaccgc tttcgaccgc gatttatgtg agatgaaaa atgtcccgca attcccattc 1740
gggcacgggc tcagttacac gaagtttgaa tacagcgact tgacaattgc ccctgagaaa 1800
atctcaccgc caggcacagt ctccatctcc gtgacggtca aaaatgtcgg cgaccgagaa 1860
ggtgacgagg ttgtccagtt gtagtgcgc gatgtcgtcg caagccgcgt ccgaccgcgt 1920
aaggaaacta aaggtttcaa cggagtgcgc ctgaagccag gtgaggctaa acgggtgact 1980
ttccacctgt ccgtgacca gttggctttt tacgaccgag cgatgaggtt cgtggttgag 2040
ccaggaaaca ttgaggtcat ggtcggaagt tcgtctgagg acattaggtt caccgcaaa 2100
tttgaattg tcggcgatgt cagggaagtt ccaggtgaaa ggtcatgtt cactcggtt 2160
gaagttgagc ccgcatga 2178

```

```

<210> 4
<211> 2247
<212> ADN
<213> Trình tự chưa biết
<220>
<223> OJ1M-273-1
<400> 4

```

```

atgtcgggtt ggggaagga acttttgccg aagatgaccc ttgaggagaa agttgcccc 60
cttggttcaa tttctgtcca caggctcatg accgacggca aatttgacat tgcaaaaggct 120
cgtgagttgc tcaagcacgg catcggtcaa atcaccgcgc tcgctggcgg cagcgattta 180
ccgcctaagg aagcagcaca actcgccaac gaaattcagc gcttctcat tgaagagacg 240
aggttgggaa ttcccgttat cgtgcacgaa gaatgcctca gcggattgat ggcgcgaggg 300
tcaacgactt tccccaaagc catcaacttg gcaagcactt ttgacccgga tttggttcgg 360
gagatgacaa cggtaattcg caaggaatg cgcgcgcgtc gagcgcatca aggtttgtcg 420
cctgtcttgg atgtccttga cgcaccacga tggggacgga cggaaagaaac tttcggcgaa 480
gaccataact tgattgcctg catggcggtc gcttacatct ccggcttgca aggcgaggat 540
ttgagggcag gcgtcattgc taccgcaaag cacttttcag gtcacggttg gcctgaaggc 600
ggtcgtaact gtgccccact tcatgtcggg ccgagagagt tcagggaagt cctctcattc 660
ccctttgaag cggcagttag ggtggcaaga gttcagtcgg tcatgaacgc ttacatgac 720
attgatggca tcccttgccg tgcttcccgc gaggttgtga ctgaccttct gcgaggcgaa 780
tggggatttg acggcatcgt cgtttcagat tacgccgccc tccacatgct tttcaatgtc 840
cacagggttg cagttgacga aaaagatgca gcctgccaa cccctttatgc aggcattgac 900
attgaactgc ccgacttgaa ctgctacgcc aaattgattg atgcgcgtcg tgagggacta 960
atctccgagg cgatcggtga caggcgagtc agggaggttc tcaactgtca ggaaagggtt 1020
ggcttggttg acaatccgcc gttcggtgac ccggaagcag cacttccgt ttttgacgcc 1080
cctgaacacc gccaaactgc tcggttgctc gctcaaaagt caattgtgtt gctcaaaaac 1140
gatggttaact tgcttccgt acgaaaagat ttgtcaggca tcgcgcgtcat cggtcctaac 1200
gccgacgacc cagcaaacat gtcggcgat tacgcttatg ttggtcactt ggacttgaa 1260
gaaacgcctg tgccaattgt gactgtcctt gaaggcatca aggcgaaagt ttcaccgcc 1320
acgaaagtcc tttacgcccc aagttgcaaa gttctggacg ggacaacgga aggaatcgcc 1380
gaagcggttg aagtcgcaaa acaagcgga gtcgttgtct tggtcgtcgg tgaccgtca 1440
ggcttggttg gcaaagggac ggtcgggcaa ggttgcgata gggttgactt gaggttccc 1500
ggtcaccaag aggaacttgt caaggctgtg gttgaaactg gcaagcccg cgtcttggtt 1560
ctcatcaacg gtcgccccgt tacgcttggt gaactcgttg acaaaaattc ggcaatagt 1620
gaggcttggt ttcccgcgga agaggttggt aatgctgttg ctgatgtttt gtttgcgat 1680
gtcaaccag gcggcaaac ctccatcac ttcccgaag tcgtcggtca agtcccgctg 1740
cactatagcc gagcaccgct ttcgaccgc gatttatgtg agatgaaaaa tgtcccgcaa 1800
ttcccattgc ggacggggt cagttacacg aagtttgaa acagcgactt gacaattgcc 1860
ccagagaaaa tttcacccgc aggcacagtc tccatctccg tgacggtcaa aaatgctcgg 1920
gaccgagaag gtgatgaggt ttccagttg tatgtccgc atgtagtcgc aagccgcgtc 1980
cgaccgcgtc aggaactcaa agttttcaag cgagtgcgc tgaagccagg tgaggctaaa 2040
cgggtgactt tccacctgtc cgctgaccag ttggctttt acgaccgagc gatgaggttc 2100
gtggttgagc caggaacaat tgaggtcatg gtcggaagtt cgtctgagga catcaggttc 2160
accggcaaat ttgaaattgt cggcgatgc agggaaagtt caggtgaaag ggtcatgttc 2220
actcaggttg aagttgagcc cgcata 2247

```

```

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi
<400> 5

```

atgtcgggttc ggggtgaagga a 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi
 <400> 6
 tcatgcgggc tcaacttcaa c 21
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi
 <400> 7
 caccatgtcg gttcgggtga aggaa 25
 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi
 <400> 8
 tagagctctc atgcgggctc aacttcaac 29
 <210> 9
 <211> 752
 <212> PRT
 <213> Candidatus Caldatribacteirum californiense
 <220>
 <223> Beta-xylosidase
 <400> 9
 Met Ala Leu Val Asn Glu Leu Leu Ser Arg Met Thr Leu Glu Glu Lys
 1 5 10 15
 Val Ala Gln Leu Cys Ala Val His Ala Ser Arg Leu Leu Glu Gly Arg
 20 25 30
 Lys Phe Ser Glu Glu Lys Ala Arg Thr Val Leu Ala His Gly Ile Gly
 35 40 45
 Gln Ile Thr Arg Leu Leu Gly Thr Pro Asp Leu Glu Pro Glu Glu Ala
 50 55 60
 Val Glu Leu Gly Asn Ala Ile Gln Arg Phe Leu Lys Glu Lys Thr Arg
 65 70 75 80
 Leu Gly Ile Pro Ala Met Ile His Glu Glu Cys Leu Ser Gly Leu Leu
 85 90 95
 Cys Lys Gly Ala Thr Val Phe Pro Gln Ala Ile Gly Leu Ala Ser Thr
 100 105 110
 Phe Asn Pro Glu Leu Val Gln Lys Val Thr Thr Thr Ile Arg Lys Thr
 115 120 125
 Met Arg Ala Leu Gly Val His Gln Gly Leu Ala Pro Val Leu Asp Ile
 130 135 140
 Pro Arg Asp Pro Arg Trp Gly Arg Thr Glu Glu Thr Phe Gly Glu Asp
 145 150 155 160
 Pro Tyr Leu Val Ser Arg Met Ala Ser Ala Tyr Ile Arg Gly Leu Gln
 165 170 175
 Gly Glu Asp Leu Arg Glu Gly Ile Val Ala Thr Ala Lys His Phe Thr
 180 185 190
 Ala Tyr Gly Ile Ser Glu Gly Arg Asn Leu Ala Pro Ala Lys Val
 195 200 205
 Gly Glu Arg Glu Leu Arg Glu Val Phe Leu Phe Pro Phe Glu Val Ala
 210 215 220
 Val Arg Glu Ala Arg Val Arg Ser Leu Met Asn Ala Tyr His Glu Ile
 225 230 235 240
 Asp Gly Val Pro Cys Ala Ala Ser Ser Phe Leu Leu Thr Lys Val Leu
 245 250 255
 Arg Glu Glu Trp Gly Phe Glu Gly Ile Val Val Ser Asp Tyr Glu Ala
 260 265 270
 Val Arg Met Leu Ala Thr Phe His His Val Ala Glu Asp Glu Lys Asp
 275 280 285
 Ala Ala Val Leu Ala Leu Arg Ala Gly Ile Asp Ile Glu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Ala Asp Cys Phe Pro His Leu Val Thr Ala Val Arg Glu Gly Cys Ile
 305 310 315 320
 Ser Glu Glu Val Leu Asn Glu Ala Val Arg Arg Val Leu Ser Val Lys
 325 330 335
 Tyr Glu Leu Gly Leu Leu Glu Gly Leu Pro Phe Ala Asp Pro Gly Asn
 340 345 350
 Val Val Leu Leu Asp Pro Pro Glu His Arg Ala Leu Ser Arg Glu Val
 355 360 365
 Ala Arg Ala Ala Leu Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Val Leu Pro Leu

```

370          375          380
Lys Lys Asp Leu Arg Ala Leu Ala Val Ile Gly Pro Asn Ala His Asp
385          390          395          400
Pro Ile Asn Leu His Gly Asp Tyr Ser Phe Thr Thr His Val Pro Ser
          405          410          415
Val Leu Ala Trp Lys Gly Arg Glu Ala Arg Trp Glu Val Ala Val Pro
          420          425          430
Thr Val Thr Val Leu Glu Gly Ile Lys Ala Lys Val Ser Pro Glu Thr
          435          440          445
Gln Val Leu Tyr Ala Arg Gly Cys Gly Leu Thr Glu Ser Ser Glu Glu
          450          455          460
Asp Leu Arg Glu Ala Leu Glu Val Ala Gln Lys Ala Glu Val Ile Val
          465          470          475          480
Ala Val Leu Gly Glu Arg Ser Gly Leu Phe Arg Gln Ser Leu Ser Gly
          485          490          495
Glu Gly Ser Asp Arg Val Asp Leu Ala Leu Pro Glu Ala Gln Arg Asn
          500          505          510
Leu Leu Lys Ala Leu Arg Glu Leu Gly Lys Pro Ile Val Leu Val Leu
          515          520          525
Val Asn Gly Arg Pro Leu Glu Leu Leu Trp Glu Tyr Glu His Ile Pro
          530          535          540
Ala Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Pro Gly Glu Glu Gly Gly Asn Ala Ile
          545          550          555          560
Ala Asp Val Leu Phe Gly Asp Tyr Asn Pro Ser Gly Arg Leu Pro Ile
          565          570          575
Ser Phe Pro Lys Ala Ser Gly Gln Val Pro Val Tyr Tyr Asn Arg Lys
          580          585          590
Pro Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Val Thr Val Asp Ala Glu Pro Leu Phe
          595          600          605
Pro Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Ala Tyr Arg Asp Leu
          610          615          620
Arg Ile Ala Pro Glu Lys Val Arg Gly Leu Glu Pro Val Thr Val Gln
          625          630          635          640
Cys Thr Val Glu Asn Thr Gly Thr Cys Glu Gly Glu Glu Val Val Gln
          645          650          655
Leu Tyr Leu Arg Asp Lys Val Ala Ser Cys Val Arg Pro Arg Gln Glu
          660          665          670
Leu Lys Gly Phe Val Lys Ile Arg Leu Val Pro Gly Glu Arg Lys Thr
          675          680          685
Val Thr Phe Thr Leu Phe Pro Glu Gln Leu Ala Phe Tyr Asp Ala His
          690          695          700
Met Arg Phe Val Val Glu Pro Gly Thr Phe Glu Val Met Val Gly Ala
          705          710          715          720
Ser Ser Arg Asp Ile Arg Leu Ser Gly Thr Phe Glu Val Leu Glu Glu
          725          730          735
Arg Val Ile Pro Lys Tyr Arg His Phe Ala Ser Glu Val Thr Val Gly
          740          745          750

```

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt chứa vùng xúc tác β -xylosidaza bao gồm:

(A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;

(B) polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0; hoặc

(C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

2. Enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo điểm 1, trong đó enzym này cũng có ít nhất một hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza.

3. Polynucleotit chứa miền mã hóa vùng xúc tác β -xylosidaza bao gồm:

(a) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;

(b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0;

(c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2, và có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0; hoặc

(d) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự

nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit ít nhất ở điều kiện nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,0.

4. Polynucleotit theo điểm 3, trong đó polypeptit này cũng có ít nhất một hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm hoạt tính α -L-arabinofuranosidaza và hoạt tính α -L-arabinopyranosidaza.

5. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 3 hoặc điểm 4, trong đó vector này có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính β -xylosidaza ở tế bào vật chủ.

6. Thẻ biến nạp chứa vector biểu hiện theo điểm 5.

7. Thẻ biến nạp theo điểm 6, trong đó thẻ biến nạp này là sinh vật nhân thật.

8. Phương pháp sản xuất enzym β -xylosidaza chịu nhiệt bao gồm bước sản sinh enzym β -xylosidaza chịu nhiệt trong thẻ biến nạp theo điểm 6 hoặc 7.

9. Hỗn hợp glycosit hydrolaza chứa enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo điểm 1 hoặc 2, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo điểm 3 hoặc 4, hoặc enzym β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 8, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác.

10. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải lignoxenluloza bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải lignoxenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa lignoxenluloza tiếp xúc với enzym β -xylosidaza chịu nhiệt theo điểm 1 hoặc 2, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo điểm 3 hoặc 4, thẻ biến nạp theo điểm 6 hoặc 7, enzym β -xylosidaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 8, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo điểm 9.

[illegible]

Fig.1B

OJ1M-273 1057 GTGTTGCTCAAAAACGATGGTAACTTGCTTCGCTACGAAAAGATTTGTCAAGCATCGCCGTCATCGGTCCAAAC 1131
 OJ1M-273-1 1126 GTGTTGCTCAAAAACGATGGTAACTTGCTTCGCTACGAAAAGATTTGTCAAGCATCGCCGTCATCGGTCCAAAC 1200
 OJ1M-273 1132 GCCGACGACCCACGAAACATGCTCGCGATTACGCTTATGTGGCTCACTTGGACTTGAAGGAAACGCCTGTGCCA 1096
 OJ1M-273-1 1201 GCCGACGACCCACGAAACATGCTCGCGATTACGCTTATGTGGCTCACTTGGACTTGAAGGAAACGCCTGTGCCA 1275
 OJ1M-273 1197 ATTGTGACTGTCTTGAAGGCATCAAGGCGAAAGTTTCGCCCCGCCACGAAAGTCCTACGCCCAAAGGTTGCGAA 1281
 OJ1M-273-1 1276 ATTGTGACTGTCTTGAAGGCATCAAGGCGAAAGTTTCGCCCCGCCACGAAAGTCCTACGCCCAAAGGTTGCGAA 1350
 OJ1M-273 1282 GTTCTGGACGGGACAAACGGAAGGAATCGCCGAAGCGGTTGAAGTCGCAAAACAAGCGGAAGTCGTGCTCTTGGTC 1356
 OJ1M-273-1 1351 GTTCTGGACGGGACAAACGGAAGGAATCGCCGAAGCGGTTGAAGTCGCAAAACAAGCGGAAGTCGTGCTCTTGGTC 1425
 OJ1M-273 1357 GTCGGTGACCGCTCAGGCTTGTTTCGGCAAAAGGACGGTCGGCGAAAGTTGCGATAGGGTTGACTTGAAGGCTTCCC 1431
 OJ1M-273-1 1426 GTCGGTGACCGCTCAGGCTTGTTTCGGCAAAAGGACGGTCGGCGAAAGTTGCGATAGGGTTGACTTGAAGGCTTCCC 1500
 OJ1M-273 1432 GGTCAACAAGAGGAACCTGTCAAGGCTGTGGTTGAAACTGGCAAGCCCGTCGCTTGGTTCTCATCAACGGTCGC 1496
 OJ1M-273-1 1501 GGTCAACAAGAGGAACCTGTCAAGGCTGTGGTTGAAACTGGCAAGCCCGTCGCTTGGTTCTCATCAACGGTCGC 1575
 OJ1M-273 1497 CCCGTTACGCTTGGGAACTCGTTGACAAAAATTCGGCAATAGTTGAGGCTTGGTTTCCGGGTGAGGAGGTTGGT 1581
 OJ1M-273-1 1576 CCCGTTACGCTTGGGAACTCGTTGACAAAAATTCGGCAATAGTTGAGGCTTGGTTTCCGGGTGAGGAGGTTGGT 1650
 OJ1M-273 1582 AATGCTGTGCTGATGTTTGTGTTGGCGATGTCAACCCAGGCGGCAACTCCCCATCACCTTCCCGAAAAGTCGTC 1656
 OJ1M-273-1 1651 AATGCTGTGCTGATGTTTGTGTTGGCGATGTCAACCCAGGCGGCAACTCCCCATCACCTTCCCGAAAAGTCGTC 1725
 OJ1M-273 1657 GGTCAAGTCCCGCTGCATATAGCCGAGCACCCTTCGCACCCGCGATTATGTGGAGATGAAAAATGTCCCGCAA 1731
 OJ1M-273-1 1726 GGTCAAGTCCCGCTGCATATAGCCGAGCACCCTTCGCACCCGCGATTATGTGGAGATGAAAAATGTCCCGCAA 1800
 OJ1M-273 1732 TTCCCATTCGGGCACGGGCTCAGTTACACGAAGTTTGAATACAGCGACTTGACAAATTGCCCTTGAGAAAAATTCA 1796
 OJ1M-273-1 1801 TTCCCATTCGGGCACGGGCTCAGTTACACGAAGTTTGAATACAGCGACTTGACAAATTGCCCTTGAGAAAAATTCA 1875
 OJ1M-273 1797 CCGCAGGCACAGTCTCCATCTCCGTGACGGTCAAAAATGTCCGGCAGCCGAGAAAGTGAAGGTTGTCCAGTTG 1881
 OJ1M-273-1 1876 CCGCAGGCACAGTCTCCATCTCCGTGACGGTCAAAAATGTCCGGCAGCCGAGAAAGTGAAGGTTGTCCAGTTG 1950
 OJ1M-273 1882 TATGTCGCGATGTGTCGCAAGCCGCTCCGACCCGTCAAGGAACCTCAAGGTTTCAAGCGAGTGACGCTGAAG 1956
 OJ1M-273-1 1951 TATGTCGCGATGTGTCGCAAGCCGCTCCGACCCGTCAAGGAACCTCAAGGTTTCAAGCGAGTGACGCTGAAG 2025
 OJ1M-273 1957 CCAGGTGAGGCTAAACGGGTGACTTCCACCTGTCCGCTGACCAGTTGGCTTTTTACGACCCGAGCGATGAGGTTT 2031
 OJ1M-273-1 2026 CCAGGTGAGGCTAAACGGGTGACTTCCACCTGTCCGCTGACCAGTTGGCTTTTTACGACCCGAGCGATGAGGTTT 2100
 OJ1M-273 2032 GTGTTGAGCCAGGAACAATTGAGGTGATGGTCGGAAGTTGCTGAGGACATGAGGCTCACCCGGCAAAATTGAA 2096
 OJ1M-273-1 2101 GTGTTGAGCCAGGAACAATTGAGGTGATGGTCGGAAGTTGCTGAGGACATGAGGCTCACCCGGCAAAATTGAA 2175
 OJ1M-273 2097 ATTGTCGGCGATGTCAAGGAAAGTTCCAGGTGAAAGGGTCATGTTCACTCGGTTGAAAGTTGAGCCCGCATGA 2178
 OJ1M-273-1 2176 ATTGTCGGCGATGTCAAGGAAAGTTCCAGGTGAAAGGGTCATGTTCACTCGGTTGAAAGTTGAGCCCGCATGA 2247

Fig.2

OJ1M-273 1 MSVRVKELLAKMTLEEKVAQLGSISVHRLMTDGFDIAKARELLKHGIGQITRVAGGSNLPPEAAQLANEIQRFLEET 80
OJ1M-273-1 1 MSVRVKELLAKMTLEEKVAQLGSISVHRLMTDGFDIAKARELLKHGIGQITRVAGGSNLPPEAAQLANEIQRFLEET 80
OJ1M-273 81 RLGIPAIVHEECLSGLMARGSTTFPQAINLASTFDPLVREMTTVIRKEMRAVGAHQGLSPVLDVLRDPRWGRTEETFE 160
OJ1M-273-1 81 RLGIPAIVHEECLSGLMARGSTTFPQAINLASTFDPLVREMTTVIRKEMRAVGAHQGLSPVLDVLRDPRWGRTEETFE 160
OJ1M-273 161 DPYLIACMAVAYISGLQGEDLRQGVATATAKHFSGHGWEGRNCAPLHVGPREFREVLSPFEEAARVARVQSVMNAYHD 240
OJ1M-273-1 161 DPYLIACMAVAYISGLQGEDLRQGVATATAKHFSGHGWEGRNCAPLHVGPREFREVLSPFEEAARVARVQSVMNAYHD 240
OJ1M-273 241 IDGIPCAASRELLTDLLRGWFGDGIWSDYAAVHMLFNVHRVAVDEKDAACQALYAGIXXXXXXXXXXXXXXXXXX-- 318
OJ1M-273-1 241 IDGIPCAASRELLTDLLRGWFGDGIWSDYAAVHMLFNVHRVAVDEKDAACQALYAGIDIPLDNCYAKLIDAVREGL 320
OJ1M-273 319 -----LFDNPPFVDPEAAPSVDPAPEHRQLARLLAQKSTVLLKNDGNLLPLRKDLSIAVIGPN 377
OJ1M-273-1 321 ISEATVDEAVRRVLTVKERLGLFDNPPFVDPEAAPSVDPAPEHRQLARLLAQKSTVLLKNDGNLLPLRKDLSIAVIGPN 400
OJ1M-273 378 ADDPRNMLGDYAYVAHLDLKETPVPITVTLLEGIAKAVSPATKVL YAKGCEVLDGTTGEGIAEAEVEAKQAEVWLVWGDRS 457
OJ1M-273-1 401 ADDPRNMLGDYAYVAHLDLKETPVPITVTLLEGIAKAVSPATKVL YAKGCEVLDGTTGEGIAEAEVEAKQAEVWLVWGDRS 480
OJ1M-273 458 GLFGKGTVGEGCDRVDLRLPGHQEELVKAVVETGKPVVLVINGRPVTLGELVDKIPAIVEAWFPGEEGGNVADVLF 537
OJ1M-273-1 481 GLFGKGTVGEGCDRVDLRLPGHQEELVKAVVETGKPVVLVINGRPVTLGELVDKIPAIVEAWFPGEEGGNVADVLF 560
OJ1M-273 538 VNPGGKLPITFPKVVGVPLHYSRAPLSHRDYVEMKNVPQFPFGHGLSYTKFEYSDLTIAPEKISPAGTVSISVTKNVG 617
OJ1M-273-1 561 VNPGGKLPITFPKVVGVPLHYSRAPLSHRDYVEMKNVPQFPFGHGLSYTKFEYSDLTIAPEKISPAGTVSISVTKNVG 640
OJ1M-273 618 DREGDEVVQLYVRDVVASRVRPVKELKGFKRVTLLKPGAKRVTFFHLSADQLAFYDRAMRFVVEPGTIEVMVGSSSEDIRL 697
OJ1M-273-1 641 DREGDEVVQLYVRDVVASRVRPVKELKGFKRVTLLKPGAKRVTFFHLSADQLAFYDRAMRFVVEPGTIEVMVGSSSEDIRL 720
OJ1M-273 698 TGKFEIVGDRVREVPGERVMFTIRVEVEPA 725
OJ1M-273-1 721 TGKFEIVGDRVREVPGERVMFTIQVEVEPA 748

Fig.3

OJ1M-273-1	1	MSVRV	KELLAKMTLEEKVAQLGSI	SVHRLITD	GKFDIAKAREELKHGIGQITRV	AGGSDLPK	KEAAQLAN	70						
Ca. C. californiense	1	MALVANELLS	MTLEEKVAQLCAV	HASRLIEGRKFSEEKARIVLAH	GIGQITRILGTPDL	PEEEAVLE	ELGN	69						
OJ1M-273-1	71	EIQRFLEET	RLGIPALVHEECLSGL	MARGSTTF	PQATINLASTFPDPLVRENTTVIRKEMRAVGAHQGLS			140						
Ca. C. californiense	70	AIQRFLEET	RLGIPALVHEECLSGL	CKGATVFPQATINLASTFPDPLVRENTTVIRKIMRALGVHQGLA				139						
OJ1M-273-1	141	PVLDMRDPRNGRTEET	FGEDPYLITACMAVAVISGLQGEDLRGV	IATAKHESGFGMP	EGGRN	CAPL	HVG	210						
Ca. C. californiense	140	PVLDMRDPRNGRTEET	FGEDPYLVSRMASAYIRGLQGEDLR	REGIVATAKHFTAYGIS	EGGRNLAPAKVG			209						
OJ1M-273-1	211	PREFREVLSPFEEAARVARV	QSSVMNAYHIDGIPCAASRELLTDLRGENGFGI	WSDYAAV	MLFNV			280						
Ca. C. californiense	210	ERELREVFLPFEEAVREARV	QSSVMNAYHIDGVP	CAASSFLLTKV	REENGFGI	WSDYEA	VRMLATF	279						
OJ1M-273-1	281	HRVAMDEKDAACQALYAGIDIEL	PDLCYAKLIDAVREGLISEAIVDEAVRRVLT	VKERLGLF	DNPPF	VD		350						
Ca. C. californiense	280	HHVAEDEKDAAVLALRAGIDIEL	PDADCEPHLMTAVREGCISEEVINEAVRRVLS	VKVELGLLEGLPFAD				349						
OJ1M-273-1	351	PEAAPSMFDAP	PEHRLARLDAQKSEIVLLKNDGILPLRKDL	SGDAVIGPNADDP	RNMLGDYAV	VAH	D--	418						
Ca. C. californiense	350	PGNV-VLLDP	PEHRLASREVARAAEVLLKNDG-VLPLKKDLRA	DAVIGPNAHDPIN	HGDYSEITTHV	PSV		417						
OJ1M-273-1	419	-----	LKETPVPI	VTVLEGIIKAKVSPATVLYAIGCEVLDGII	EGTAEAVEVA	DAEVVVL	VWGRS	480						
Ca. C. californiense	418	LAWKGREARWEVAVPT	VTVLEGIIKAKVSPETVLYAIGCGIT	ESSEEDIREA	LEVA	DAEVTV	AVLIGERS	487						
OJ1M-273-1	481	GLFGKSTVGEGCD	RDVLRIPGHQEEELUKAVMEIGKPVVLV	LNGRPTILGELVDKIPAT	IVEAM	EPGEEGG		550						
Ca. C. californiense	488	GLFRQSLSGEGS	DRVDLALPEAQRLLEKALRELKPVVLV	LNGRPTILLWEVETIPAT	IEAM	PGEEGG		557						
OJ1M-273-1	551	NAVADVLF	GDVNP	GGKLPITFPKVVGOVPLIYSRAPLS	HRVVEK	KNVPQFPFGHGLSYTKFEYS	DLTITA	620						
Ca. C. californiense	558	NAVADVLF	GDVNP	SGRLPISFPKASGOVPLIYSRAPLS	HRVVEK	KNVPQFPFGHGLSYTIFAYRDL	RTA	627						
OJ1M-273-1	621	PEKIS	PAGTIVSVTKNV	GDREG	EVVQLYVRDMAS	VRP	VKELGFK	RMVLKPG	EAQRVTFL	SADQ	690			
Ca. C. californiense	628	PEKVRGLEP	IVIVQCTVENITGTC	EEVQVLYERDKVAS	VRPRQELKGV	XIRL	MPGERK	IVTFTL	LFPEQ		697			
OJ1M-273-1	691	LAFYDRAM	RFWEPTGIEVMV	GGSS	EDIRLIGKFEIVG	VR	PG	RM	FIO	VE	PA*	748		
Ca. C. californiense	698	LAFYDAH	MRFWEPGT	FEVMV	GGSS	DIRLSGIF	EVLL	EE	RV	IP	KYRHF	ASE	VTG	752

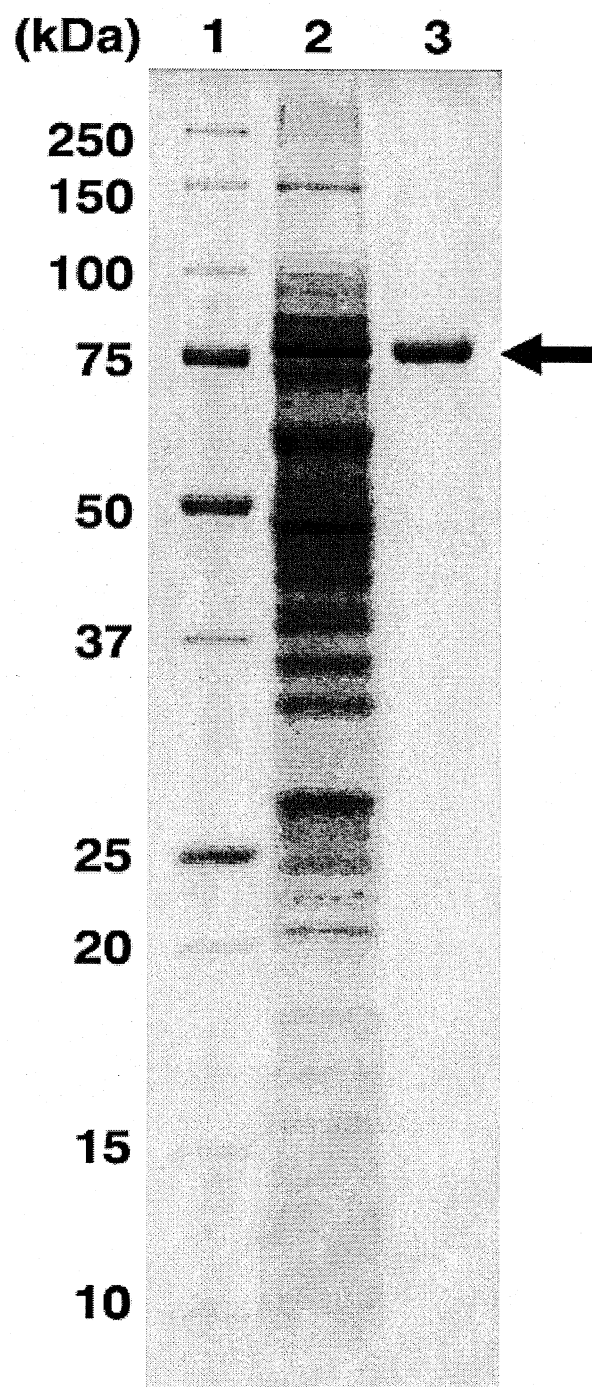
Fig.4

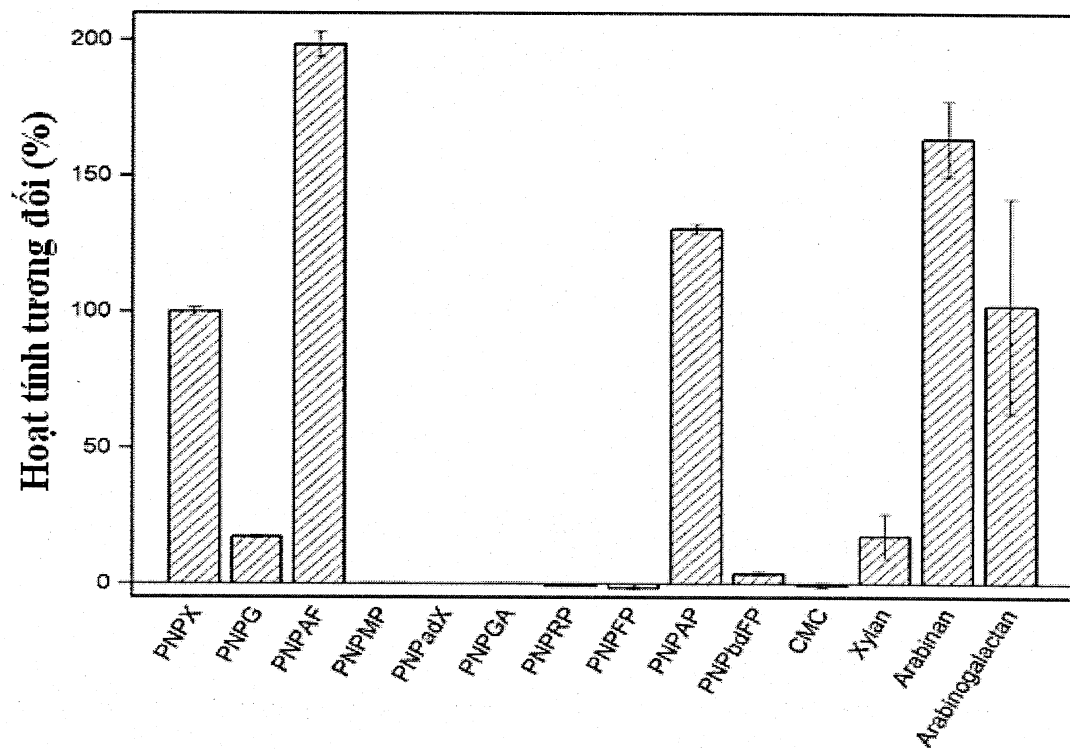
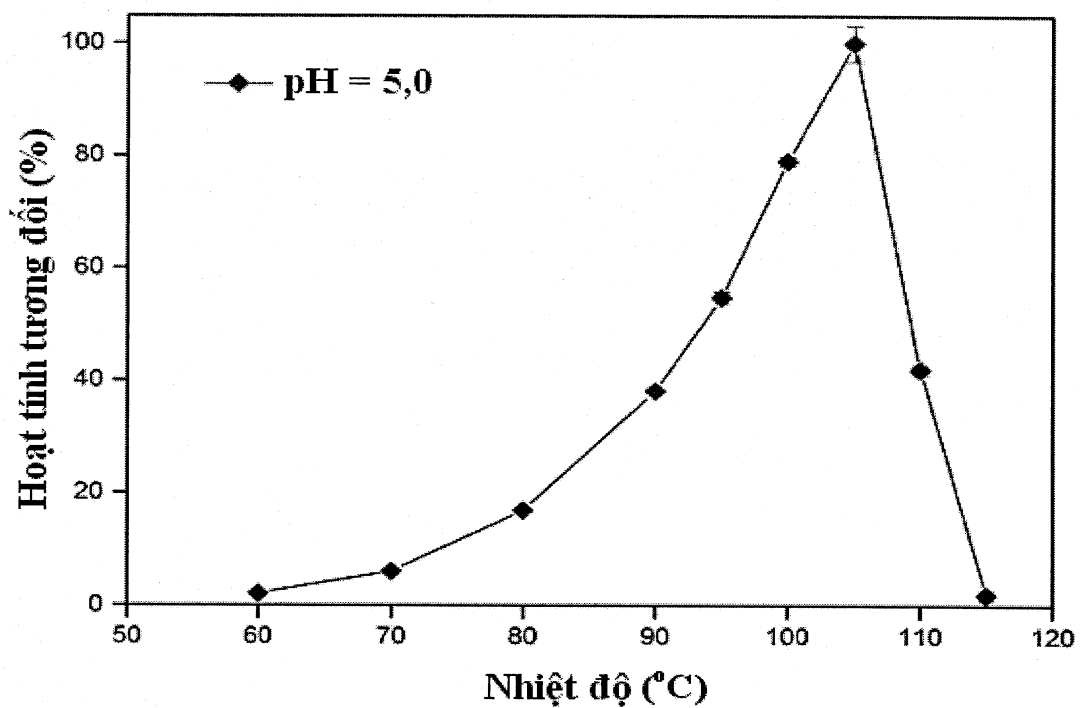
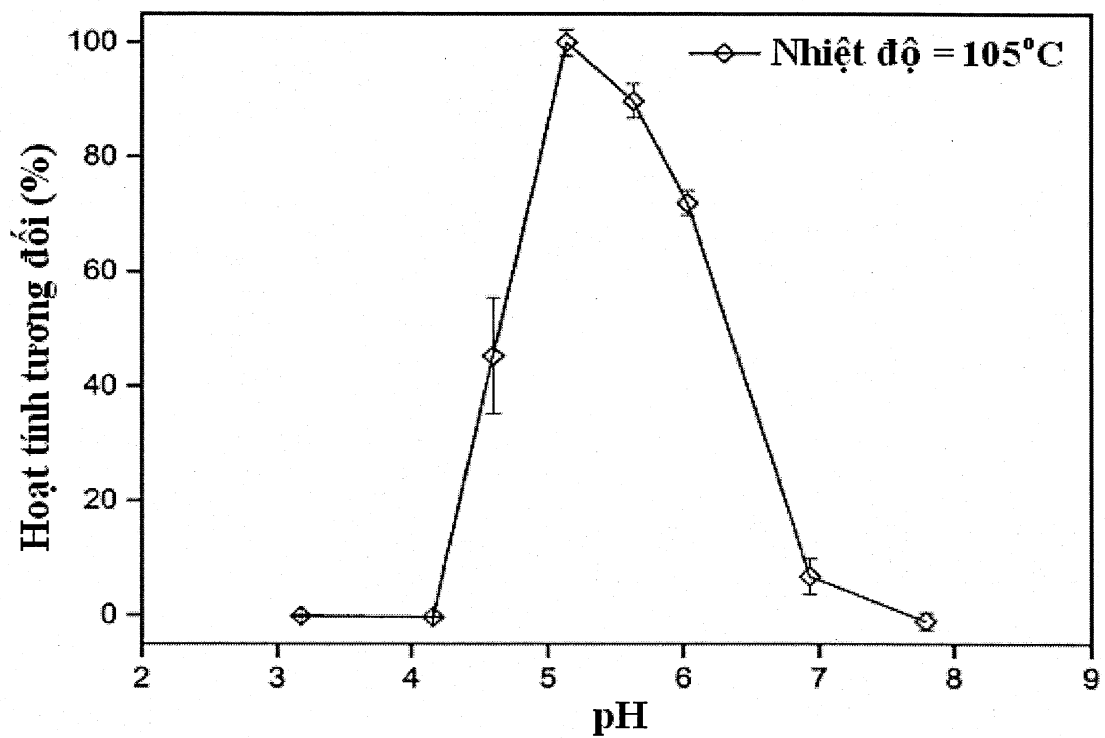
Fig.5**Fig.6**

Fig.7**Fig.8**