



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

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

(11)



1-0026845

(51)⁷ C12N 9/42; C12N 9/98; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2015-00798

(22) 11/03/2015

(30) 2014-050083 13/03/2014 JP

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/09/2015 330A

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

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

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

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT XENLOBIOHYĐROLAZA SIÊU CHỊU NHIỆT, THỂ BIẾN NẠP VÀ VECTƠ BIỂU HIỆN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất xenlobiohyđrolaza siêu chịu nhiệt bao gồm bước nuôi cấy thể biến nạp biểu hiện axit nucleic mã hóa vùng xenlobiohyđrolaza chứa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, và có serin ở vị trí số 88, phenylalanin ở vị trí số 230, và serin ở vị trí số 414 của trình tự axit amin này, trong đó xenlobiohyđrolaza siêu chịu nhiệt này có hoạt tính xenlobiohyđrolaza ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0. Sáng chế cũng đề cập đến thể biến nạp và vectơ biểu hiện.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym và xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt thu được bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do sinh khối lignoxenluloza có rất nhiều trên trái đất, nên nhiên liệu sinh học, như etanol sản xuất từ nguyên liệu lignoxenluloza, được dự đoán là nguồn năng lượng thay thế nhiên liệu hóa thạch. Để biến đổi lignoxenluloza thành etanol, cần thủy phân xenluloza hoặc hemixenluloza. Các phương pháp thủy phân xenluloza được phân loại thành thủy phân bằng axit sulfuric và thủy phân bằng enzym. Không như phương pháp thủy phân bằng axit sulfuric, phương pháp thủy phân xenluloza bằng enzym sử dụng glycosit hydrolaza (cũng được gọi là enzym xenlulaza) có ưu điểm không tạo ra cặn axit sulfuric, tiêu thụ ít năng lượng, và năng suất cao hơn mà không cần phân giải quá nhiều lignoxenluloza.

Xenluloza cấu thành tế bào thực vật có cấu trúc tinh thể, trong đó các phân tử xenluloza được liên kết với nhau bằng liên kết hydro mạnh, do đó xenluloza thực tế không hòa tan trong nước. Đồng thời, phản ứng thủy phân xenluloza bằng enzym là phản ứng rắn-lỏng. Trong phản ứng rắn-lỏng này, quá trình thủy phân tinh thể xenluloza xảy ra trên bề mặt rắn, do đó hiệu suất thủy phân bằng enzym thấp. Chẳng hạn, khi dùng xenlobiohydrolaza (CBH) làm xenluloza hydrolaza chính, thì tốc độ thủy phân thấp hơn một hoặc hai bậc so với tốc độ thủy phân của các polysacarit lyaza khác. Do đó, cần sử dụng lượng lớn enzym này để thủy phân sinh khối xenluloza, và đây chính là yếu tố làm tăng chi phí sản xuất nhiên liệu sinh học từ xenluloza. Để giảm chi phí sản xuất etanol từ xenluloza, cần cải thiện hiệu suất thủy phân của enzym xenlulaza.

Một trong số phương pháp cải thiện hiệu suất enzym là cải thiện độ ổn định nhiệt của protein enzym. Để cải thiện độ ổn định nhiệt của protein enzym, người ta đã thử nghiệm các phương pháp khác nhau nhằm tái tạo cấu trúc enzym bằng cách chèn thêm đột biến axit amin, như phương pháp tiến hóa hướng (directed evolution - DE), trong đó trình tự axit amin được thay thế ngẫu nhiên, phương pháp đột biến điểm có định hướng

(site-directed mutagenesis - SDM), trong đó đột biến thay thế axit amin chỉ xảy ra ở vị trí cụ thể, và phương pháp tạo ra trình tự thể khảm bằng cách phân cắt nhiều gen ở nhiều vị trí, sau đó làm xáo trộn các mảnh gen.

Về mặt lý thuyết, quá trình cải biến enzym bằng phương pháp DE có hiệu suất thấp. Điều này là do có “sự bùng nổ tổ hợp”, trong đó số lượng các biến thể tăng theo cấp số nhân khi số lượng các đột biến điểm tăng. Để thu được trình tự axit amin tối ưu và thực hiện thử nghiệm đánh giá chức năng amin, cần thiết kể các thư viện thể đột biến kết hợp toàn bộ các gốc axit amin, tuy nhiên về nguyên tắc không thể thực hiện được điều này. Hơn nữa, trong khi hầu hết các thể đột biến là đột biến làm mất chức năng, thì các đột biến có lợi, như đột biến trung tính hoặc đột biến làm tăng chức năng là loại rất hiếm gặp, và khiến cho không thể dùng phương pháp DE làm công cụ tìm kiếm trình tự axit amin tối ưu.

Do nhiều thư viện thể đột biến cần được sàng lọc để thu được các thể đột biến có lợi, và chưa có phương pháp sàng lọc hiệu suất cao hoặc hệ biểu hiện gen thích hợp (ví dụ, xem Himmel và cộng sự, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, vol. 10, p. 358~364.), nên chức năng của enzym xenlulaza vẫn chưa được cải thiện đáng kể bằng phương pháp DE.

Nakazawa và cộng sự đã tái tạo cấu trúc endoglucanaza EGIII của nấm ăn gỗ, *Trichoderma reesei* bằng phương pháp DE (xem Nakazawa và cộng sự, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 83, p. 649~657). Endoglucanaza EGIII là protein chứa 218 gốc axit amin và có trọng lượng phân tử tương đối nhỏ. Tuy nhiên, thậm chí trong trường hợp protein kích cỡ nhỏ như vậy, do sự bùng nổ tổ hợp số lượng các biến thể thu được bằng cách chèn thêm đột biến thay thế axit amin vào một vị trí bất kỳ đã bằng 4360 (20×218); số lượng các biến thể thu được bằng cách chèn thêm đột biến vào hai vị trí bất kỳ đã bằng 9460000 ($20 \times 20 \times 218 \times 217 \div 2$); và số lượng các biến thể thu được bằng cách chèn thêm đột biến vào ba vị trí bất kỳ đã bằng 13624130000 ($20 \times 20 \times 20 \times (218 \times 217 \times 216 \div 6)$).

Để thu được các biến thể, trong đó đột biến chỉ xuất hiện ở hai đến ba vị trí, thì cần thiết kể hàng chục triệu đến hàng chục tỷ thư viện thể đột biến, và cần phải sàng lọc chức năng của chúng. Do đó, phương pháp này là không thể áp dụng được trên thực tế. Mặc dù Nakazawa và cộng sự đã thực hiện quá trình sàng lọc chức năng của 11000 thể

đột biến thể hệ một và thể hệ hai, nhưng nhiệt độ tối ưu của chúng chỉ tăng $+5^{\circ}\text{C}$, và độ ổn định nhiệt của các thể đột biến này không được cải thiện. Khi thu viện thể đột biến có kích cỡ nhỏ, thì không tạo ra được các thể đột biến có lợi. Ngoài ra, từ 9000 khuẩn lạc của thư viện thể đột biến ở thể hệ thứ nhất được sàng lọc chức năng, chỉ thu được các biến thể có hoạt tính thủy phân CMC từ 46 khuẩn lạc. 8954 thể đột biến còn lại được xem là không có chức năng do đột biến axit amin hoặc biểu hiện gen không thành công, và hầu hết các đột biến ngẫu nhiên tạo ra bởi phản ứng PCR dễ lỗi của phương pháp DE dẫn đến làm mất chức năng của protein enzym. Theo cách này, do phương pháp DE tạo ra nhiều thể đột biến không có chức năng, nên hiệu suất sàng lọc của chúng rất thấp.

Phương pháp xáo trộn gen cũng không thu được các gen thể khảm có độ ổn định nhiệt cao hơn gen gốc của chúng. Heinzelman và cộng sự đề cập đến phương pháp cải thiện chức năng của enzym bằng cách tạo ra các gen thể khảm bằng cách phân cắt nhiều gen mã hóa xenlobiohydrolaza ở nhiều vị trí và xáo trộn các mảnh của chúng (xem Heinzelman và cộng sự, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, p. 5610~5615). Theo phương pháp này, để cải thiện độ ổn định nhiệt của exoglucanaza CBH II của *Trichoderma reesei*, thì các gen mã hóa enzym CBH II của nấm sợi ưa nhiệt *Humicola insolens* và *Chaetomium thermophilum* được liên hợp với nhau bằng cách xáo trộn gen, nhờ đó thu được enzym thể khảm. Tuy nhiên, độ ổn định nhiệt của enzym thể khảm này không cao hơn độ ổn định của gen gốc CBH II của nấm sợi ưa nhiệt *Chaetomium thermophilum*, và phương pháp xáo trộn gen tỏ ra không hiệu quả.

Trong khi phương pháp DE là phương pháp đột biến thay thế axit amin một cách ngẫu nhiên, thì phương pháp SDM là phương pháp gây đột biến thay thế, loại bỏ hoặc chèn thêm các axit amin dựa trên dữ liệu về cấu trúc không gian ba chiều của các enzym protein. Không giống phương pháp DE, phương pháp SDM không cần sàng lọc nhiều thể đột biến. Tuy nhiên, khó xác định được vị trí có tác dụng cải thiện chức năng của enzym, và phương pháp SDM không cải thiện đáng kể enzym xenlulaza.

Đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của xenlobiohydrolaza có cấu trúc vòng lặp và tạo ra cấu trúc dạng ống bao quanh trung tâm hoạt động. Dựa trên cấu trúc này, phương pháp SDM để thay thế axit amin bên trong vòng lặp đã được thử nghiệm. Để cải thiện độ ổn định nhiệt, Zhang và cộng sự đã dự đoán cấu trúc không gian ba chiều của

xenlobiohydrolaza TfCel6B lấy từ xạ khuẩn ưa nhiệt *Thermobifida fusca*, và chèn thêm liên kết disulfua vào vòng lặp của đầu tận cùng N và đầu tận cùng C để tạo thành cấu trúc dạng ống của trung tâm hoạt động bởi đột biến kép. Tuy nhiên, trái với sự mong đợi của các tác giả này, biến thể thu được có nhiệt độ T_{50} ở đó hoạt tính enzym giảm một nửa giảm 10°C (xem Zhang và cộng sự, *European Journal of Biochemistry*, 2000, vol. 267, p. 3101~3115). Zhang và cộng sự đã phát hiện thấy rằng mặc dù các gốc glyxin ở 4 vị trí đã được thay thế bằng alanin, serin, và prolin, nhưng vẫn không thu được thể đột biến xenlobiohydrolaza có độ ổn định nhiệt được cải thiện, và độ ổn định nhiệt giảm từ 5°C đến 10°C ở hầu hết các thể đột biến.

Ngoài ra, để cải thiện độ ổn định nhiệt của xenlobiohydrolaza TrCel6A thuộc họ GH6 của nấm sợi *T. reesei*, Wohlfahrt và cộng sự đã tạo ra biến thể bằng cách chèn thêm đột biến vào các gốc axit amin nằm ở vòng lặp tận cùng N và vòng lặp tận cùng C và các gốc axit amin nằm gần các vòng lặp này, và kết quả là nhiệt độ biến tính (T_m) của biến thể này đã tăng ở độ pH bằng 7,0, nhưng T_m giảm ở độ pH bằng 5,0 - là độ pH tối ưu của TrCel6A thể tự nhiên (xem Wohlfahrt và cộng sự, *Biochemistry*, 2003, vol. 42, p. 10095~10103). Đồng thời, để làm ổn định cấu trúc ngoài vòng lặp tạo ra cấu trúc dạng ống của trung tâm hoạt động của xenlobiohydrolaza TrCel7A thuộc họ GH7 của nấm sợi *T. reesei*, von Ossowski và cộng sự đã tổng hợp biến thể bằng cách chèn thêm liên kết SS (disulfua) vào vòng lặp, nhưng độ ổn định nhiệt của biến thể này không được cải thiện (xem von Ossowski và cộng sự, *Journal of Molecular Biology*, 2003, vol. 333, p. 817~829). Như nêu trên, mặc dù đã có nhiều phương pháp chèn thêm liên kết hydro hoặc liên kết SS vào vòng lặp đầu tận cùng C để tạo thành cấu trúc vòng lặp, điều được cho là có ảnh hưởng mạnh tới chức năng của enzym xenlobiohydrolaza, nhưng vẫn chưa có phương pháp nào cải thiện được chức năng của enzym, như cải thiện độ ổn định nhiệt.

Từ sự so sánh giữa các gen tương đồng của các loài, đã phát hiện được vùng có tính bảo tồn cao và vùng thường xuyên bị đột biến axit amin. Vùng bảo tồn này được gọi là “trình tự đồng nhất” do nó là trình tự chung đặc trưng cho protein của loài cụ thể. Khi gốc axit amin ở trình tự đồng nhất được đột biến, thì enzym sẽ bị mất chức năng của nó. Do đó, vị trí này có tính bảo tồn cao trong quá trình tiến hóa lâu dài. Theo đó, thể đột biến có đột biến axit amin ở trình tự đồng nhất rất dễ bị mất chức năng. Do đó, phương pháp SDM đã tìm cách gây đột biến ở protein ngoài vùng trình tự đồng nhất. Tuy nhiên,

phương pháp này chỉ có thể áp dụng được cho các enzym có cấu trúc protein dạng không gian ba chiều được xác định bằng phân tích cấu trúc tinh thể tia X, và cho đến nay mới chỉ xác định được cấu trúc không gian ba chiều của một vài protein enzym.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp thu nhận biến thể có hoạt tính tăng.

Một mục đích khác của sáng chế là đề cập đến xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt thu được bằng phương pháp nêu trên, polynucleotit mã hóa nó, vector biểu hiện nó, thể biến nạp chứa vector này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng enzym này.

Để đạt được các mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã thực hiện nghiên cứu chuyên sâu và phát hiện thấy rằng khi phương pháp PCR khuôn lạc được thực hiện với số lượng lớn khuôn lạc chứa ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao, ví dụ 300 khuôn lạc chứa ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao hoặc ít hơn, bằng cách sử dụng đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự bazơ mã hóa enzym xenlobiohydrolaza được phân tách từ ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao, có thể thu được biến thể tự nhiên có đột biến thay thế nhiều axit amin hoặc có hoạt tính của nhiều xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt có dạng đa hình đơn nucleotit thể ẩn (single nucleotide polymorphism - SNP) và hoàn thành sáng chế này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện sự sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của các biến thể enzym AR19G-166RA, AR19G-166QV, AR19G-166QA, và AR19G-166RASFS theo ví dụ 1.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE thực hiện theo ví dụ 1 đối với protein enzym xenlobiohydrolaza mã hóa bởi các biến thể tự nhiên chứa gen AR19G-166.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA của protein enzym xenlobiohydrolaza mã hóa bởi các biến thể tự nhiên chứa gen AR19G-166 theo ví dụ 1.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính xenlobiohydrolaza của biến thể AR19G-166RASFS với các cơ chất tương ứng theo ví dụ 1.

Fig.5 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA của biến thể AR19G-166RASFS ở các nhiệt độ tương ứng theo ví dụ 1.

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA (50°C, 70°C, hoặc 90°C) của biến thể AR19G-166RASFS ở các độ pH tương ứng theo ví dụ 1.

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả đo nhiệt độ T_{50} , là nhiệt độ ở đó hoạt tính thủy phân PSA của biến thể AR19G-166RASFS giảm 50% sau khi ủ sơ bộ trong 40 phút, theo ví dụ 1.

Fig.8 là đồ thị thể hiện sự thay đổi mật độ huỳnh quang của thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO do sự biến tính nhiệt của các protein enzym tương ứng của các biến thể mang đột biến thay thế axit amin AR19G-166RA và AR19G-166RASFS của biến thể AR19G-166RA theo ví dụ 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “biến thể tự nhiên” được dùng trong bản mô tả để chỉ thể đột biến được tạo ra một cách tự nhiên (tức là được tạo ra ngẫu nhiên) thay vì được tạo ra bằng phương pháp nhân tạo.

Thuật ngữ “siêu chịu nhiệt” được dùng trong bản mô tả để chỉ nhiệt độ tối ưu của hoạt tính enzym hoặc nhiệt độ biến tính của protein enzym bằng 80°C hoặc cao hơn.

Phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym, phương pháp sản xuất biến thể của enzym, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt, polynucleotit mã hóa nó, vector biểu hiện nó, thể biến nạp chứa vector này, phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza này, hỗn hợp xenlulaza, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế được thể hiện trong các phương án sau.

1. Phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym có hoạt tính bao gồm:

(1) bước phát hiện trình tự khung đọc mã mở (Khung đọc mã mở - ORF) của protein có hoạt tính enzym từ cơ sở dữ liệu gen chứa các trình tự bazơ của ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường;

(2) bước điều chế ít nhất một sản phẩm tách dòng PCR chứa toàn bộ trình tự ORF,

một đoạn của trình tự ORF, hoặc trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF, bằng cách thực hiện quá trình tách dòng PCR trên ít nhất một ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường bằng cách sử dụng đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự ORF thu được ở bước (1);

(3) bước xác định trình tự bazơ và trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự bazơ này đối với mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2); và

(4) bước chọn lọc biến thể tự nhiên của enzyme có hoạt tính bằng cách đo hoạt tính enzyme của các protein mã hóa bởi mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2).

2. Phương pháp sản xuất biến thể của enzyme có hoạt tính bao gồm:

(1) bước phát hiện trình tự ORF của protein có hoạt tính enzyme từ cơ sở dữ liệu gen chứa các trình tự bazơ của ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường;

(2) bước điều chế ít nhất một sản phẩm tách dòng PCR chứa toàn bộ trình tự ORF, một đoạn của trình tự ORF, hoặc trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF, bằng cách thực hiện quá trình tách dòng PCR trên ít nhất một ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường bằng cách sử dụng đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự ORF thu được ở bước (1);

(3) bước xác định trình tự bazơ và trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự bazơ này đối với mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2);

(4) bước đo hoạt tính enzyme của các protein mã hóa bởi mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2);

(5) bước đánh giá mối tương quan giữa trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF và hoạt tính enzyme sau khi thực hiện bước (3) và bước (4); và

(6) bước sản xuất biến thể của enzyme có hoạt tính được cải thiện do loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF, dựa trên mối tương quan giữa trình tự axit amin và hoạt tính enzyme thu được ở bước (5).

3. Phương pháp sản xuất biến thể của enzym theo phương án 2, trong đó ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường là ADN hệ gen môi trường được tách chiết từ quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao, và enzym này là enzym chịu nhiệt có hoạt tính ở nhiệt độ ít nhất bằng 70°C.

4. Phương pháp sản xuất biến thể của enzym theo phương án 2 hoặc 3, trong đó enzym này là xenlulaza.

5. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza chứa (A) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, (B) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 (trong đó gốc serin ở vị trí số 88, gốc phenylalanin ở vị trí số 230, và gốc serin ở vị trí số 414 trên trình tự axit amin này, trong đó đột biến loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung axit amin chưa xuất hiện, không được đột biến) và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5, hoặc (C) polypeptit có trình tự axit amin (tức là trên trình tự axit amin này, vị trí số 88 là serin, vị trí số 230 là phenylalanin, và vị trí số 414 là serin) có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5.

6. Polynucleotit chứa miền mã hóa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza chứa (a) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, (b) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 (trong đó gốc serin ở vị trí số 88, gốc phenylalanin ở vị trí số 230, và gốc serin ở vị trí số 414 trên trình tự axit amin này, trong đó đột biến loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung axit amin chưa xuất hiện, không được đột biến) và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5, (c) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin (tức là trên trình tự axit amin này, vị trí số 88 là serin, vị trí số 230 là phenylalanin, và vị trí số 414 là serin) có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5, (d) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID

NO: 2 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5, hoặc (e) trình tự bazơ mã hóa polypeptit - là trình tự bazơ của polynucleotit được lai hóa với polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 trong điều kiện nghiêm ngặt và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5.

7. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo phương án 6 và vector này có thể biểu hiện polypeptit có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5 ở tế bào vật chủ.

8. Thể biến nạp chứa vector biểu hiện theo phương án 7.

9. Thể biến nạp theo phương án 8, trong đó thể biến nạp này là vi sinh vật nhân thực.

10. Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt bao gồm bước sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt trong thể biến nạp theo phương án 8 hoặc 9.

11. Hỗn hợp xenlulaza chứa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo phương án 5 hoặc xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo phương án 10 và ít nhất một loại xenlulaza khác.

12. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo phương án 5, thể biến nạp theo phương án 8 hoặc 9, hoặc xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp theo phương án 10.

13. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo phương án 12 còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với ít nhất một loại xenlulaza khác.

Có thể thu được biến thể enzyme có hoạt tính tăng bằng phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzyme và phương pháp sản xuất biến thể của enzyme theo sáng chế.

Hơn nữa, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5. Do đó, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế thích hợp để thủy phân xenluloza ở nhiệt độ cao.

Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit này, và thể biến nạp chứa vectơ này cũng thích hợp để sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế.

Phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym theo sáng chế

Phương pháp theo sáng chế (cũng được gọi là “phương pháp điều chế biến thể tự nhiên”) là phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym có hoạt tính từ ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường, bằng cách sử dụng đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự khung đọc mã mở (Khung đọc mã mở - ORF) của gen mã hóa enzym này.

ADN hệ gen môi trường có thể được tạo ra từ quần thể vi sinh vật môi trường bằng phương pháp đã biết, ví dụ kit chiết tách ADN (ISOIL Large for Beads ver. 2, NIPPON GENE CO., LTD.).

Khi thư viện biến thể được tạo ra chỉ bằng cách thu nhận các thể đột biến làm tăng chức năng, thì không cần sàng lọc để loại bỏ nhiều thể đột biến không có hoạt tính được tạo ra, và thu được các biến thể có hoạt tính được cải thiện bằng cách đánh giá hoạt tính trên một vài biến thể có đột biến thay thế axit amin. ADN hệ gen môi trường được tách chiết từ quần thể vi sinh vật môi trường bao gồm nhiều biến thể tự nhiên có hoạt tính tăng. Do đó, khi ADN hệ gen môi trường được sử dụng làm khuôn, thì có thể thu được các biến thể có hoạt tính tăng.

Thuật ngữ “có hoạt tính” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự khác biệt đáng kể về số lượng đầu dạng khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu với ít nhất một cơ chất, so với mẫu đối chứng âm.

ADN hệ gen môi trường được tách chiết từ quần thể vi sinh vật môi trường là do nhiều biến thể tự nhiên có hoạt tính tăng có thể được giải trình tự dựa trên thuyết tiến hóa phân tử trung tính. Dạng đa hình đơn nucleotit (Single nucleotide polymorphism - SNP) là một dạng đa hình của trình tự bazơ thường xuất hiện ở ADN bộ gen. Ví dụ, ở ADN bộ gen người, SNP có tần xuất xuất hiện gần bằng 1 bazơ/1000 bazơ. SNP xuất hiện ở các gen gây đột biến axit amin hoặc gây đột biến lặn mà không gây đột biến axit amin, như đột biến thay thế đồng nghĩa hoặc SNP trên đoạn intron. Trong một số trường hợp, khi SNP gây đột biến axit amin, thì các protein mã hóa bởi gen này bị biến đổi cấu trúc hoặc

chức năng. Theo thuyết tiến hóa phân tử trung tính (Kimura, Nature, 1968, vol. 217 (5129), p. 624~626), đột biến gen do thay thế axit amin, mà có thể có ảnh hưởng bất lợi đến khả năng sống sót của các cá thể do làm giảm hoặc mất chức năng, do đó ảnh hưởng bất lợi đến sự tiến hóa, được loại trừ khỏi nhóm. Ngược lại, khi đột biến là đột biến trung tính hoặc đột biến có lợi, thì cá thể mang gen đột biến này không bị loại trừ khỏi nhóm. Gen này được di truyền đến thế hệ kế tiếp, và sự đa dạng gen như SNP được di truyền. Theo thuyết tiến hóa phân tử trung tính, biến thể tự nhiên có SNP do thay thế axit amin được xem là đột biến có lợi hoặc đột biến trung tính không làm giảm chức năng, tức là thể đột biến có chức năng tăng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của enzym có hoạt tính bao gồm:

(1) bước phát hiện trình tự ORF của protein có hoạt tính enzym từ cơ sở dữ liệu gen chứa các trình tự bazơ của ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường

(2) bước điều chế ít nhất một sản phẩm tách dòng PCR chứa toàn bộ trình tự ORF, một đoạn của trình tự ORF, hoặc trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF, bằng cách thực hiện quá trình tách dòng PCR trên ít nhất một ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường bằng cách sử dụng đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự ORF thu được ở bước (1)

(3) bước xác định trình tự bazơ và trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự bazơ này đối với mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2)

(4) bước chọn lọc biến thể tự nhiên của enzym có hoạt tính bằng cách đo hoạt tính enzym của các protein mã hóa bởi mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được ở bước (2)

ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường được tách chiết bằng cách phân cắt ADN bộ gen của quần thể vi sinh vật môi trường (nhóm vi sinh vật chứa trong mẫu môi trường) thành các đoạn nhỏ. ADN hệ gen môi trường được tách chiết từ quần thể vi sinh vật có trong đất, bùn, nước hồ, nước biển, và môi trường tương tự có thể được sử dụng làm ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường theo sáng chế. Để thu được biến thể enzym có độ ổn định nhiệt cao, tốt hơn nếu sử dụng ADN hệ

gen môi trường được tách chiết từ quần thể vi sinh vật chứa trong mẫu môi trường có nhiệt độ cao. Ví dụ về mẫu môi trường có nhiệt độ cao bao gồm mẫu đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng và mẫu môi trường tương tự. Ví dụ về “mẫu đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng” bao gồm mẫu nước ở khu vực suối nước nóng và các mẫu môi trường tương tự chứa đất, bùn, và sinh khối có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 80°C, và các mẫu tương tự.

Trong phương pháp điều chế biến thể tự nhiên có hoạt tính theo sáng chế, trong bước (1), trình tự ORF của protein có hoạt tính enzym được phát hiện từ cơ sở dữ liệu gen chứa các trình tự bazơ của ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường. Cơ sở dữ liệu gen này có thể được tạo ra bằng phương pháp, như phương pháp giải trình tự hàng loạt được sử dụng để phân tích trình tự ADN mạch dài trên ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường.

Cụ thể, ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường được lắp ráp và đánh dấu bằng dữ liệu giải trình tự hàng loạt, và trình tự ORF mã hóa trình tự axit amin đặc hiệu được phát hiện. Trình tự ORF của protein có hoạt tính enzym mục tiêu có thể được phát hiện bằng kỹ thuật đã biết, như phân tích độ tương đồng (độ tương đồng trình tự) của trình tự bazơ dựa trên trình tự bazơ của gen có hoạt tính enzym mục tiêu và gen có trình tự bazơ đã biết. Tốt hơn nếu, phân tích độ tương đồng được thực hiện để phát hiện trình tự có độ tương đồng bằng 30% hoặc cao hơn so với trình tự bazơ của gen có hoạt tính enzym và gen có trình tự bazơ đã biết.

Sau đó, thực hiện bước (2), bằng cách sử dụng đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự ORF thu được ở bước (1), quá trình tách dòng PCR được thực hiện trên ít nhất một ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật môi trường. Tốt hơn nếu, đoạn môi được sử dụng là đoạn môi được thiết kế để có thể khuếch đại ít nhất một miền chứa vùng xúc tác của enzym trên trình tự ORF bằng phương pháp PCR. Bằng cách thực hiện phương pháp PCR từ ADN hệ gen môi trường này, có thể tách dòng được ít nhất một sản phẩm PCR, chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự ORF có chiều dài đầy đủ; một phần trình tự ORF; hoặc trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF.

Sau đó, trình tự bazơ của mỗi sản phẩm tách dòng PCR thu được trong bước (2) được phân tích, và trình tự axit amin mã hóa bởi sản phẩm tách dòng PCR này được xác

định (bước (3)). Sau đó, protein mã hóa bởi sản phẩm tách dòng PCR được sản xuất, hoạt tính enzym của protein được đo, và biến thể của enzym có hoạt tính được chọn lọc (bước (4)). Theo cách này, biến thể của enzym có hoạt tính có thể thu được một cách chọn lọc.

Theo sáng chế, tốt hơn nếu thực hiện quá trình tách dòng PCR trên số lượng lớn ADN hệ gen môi trường thu được từ các nguồn khác nhau bằng cách sử dụng cùng đoạn môi. Khi quá trình tách dòng PCR không chỉ được thực hiện trên khuôn ADN hệ gen môi trường dùng để thiết kế đoạn môi mà còn trên nhiều ADN hệ gen môi trường thu được từ các nguồn khác nhau, thì thư viện PCR được tạo ra bằng cách thu thập các khuẩn lạc mang plasmit chứa các đoạn khuếch đại của đoạn môi được thiết kế trên quy mô lớn, ví dụ, bằng cách thu thập hàng trăm khuẩn lạc hoặc nhiều hơn, thì có thể thu được nhiều biến thể có đột biến thay thế axit amin (các biến thể tự nhiên) của gen mã hóa enzym này.

Nhìn chung, trong quá trình tách dòng PCR, các gen mục đích được tách dòng bằng cách thu thập từ 1 đến 10 khuẩn lạc. Tuy nhiên, theo phương pháp điều chế biến thể tự nhiên của sáng chế, tốt hơn nếu quá trình tách dòng gen được thực hiện bằng cách thu thập nhiều khuẩn lạc, ví dụ ít nhất 100 khuẩn lạc/mẫu ADN hệ gen môi trường. Theo cách này, có thể tạo ra thư viện gồm các biến thể tự nhiên chứa các SNP khác nhau của gen mã hóa enzym mục tiêu.

Phương pháp sản xuất biến thể của enzym theo sáng chế

Theo sáng chế, thư viện biến thể tự nhiên được tạo ra nêu trên được sàng lọc chức năng, và theo cách này, chức năng của enzym, như độ ổn định nhiệt được cải thiện hữu hiệu. Theo đó, có thể có thể sản xuất được biến thể enzym thế hệ mới có hoạt tính được cải thiện.

Phương pháp sản xuất biến thể của enzym theo sáng chế (cũng được gọi là “phương pháp sản xuất biến thể”) còn bao gồm các bước (5) và bước (6) ngoài các bước từ (1) đến (4).

(5) bước đánh giá mối tương quan giữa trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF và hoạt tính enzym của nhiều biến thể sau khi thực hiện bước (3) và bước (4)

(6) bước sản xuất biến thể của enzym có hoạt tính được cải thiện do loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF, dựa trên mối tương quan giữa trình tự axit amin và hoạt tính enzym thu được ở

bước (5).

Thuật ngữ “cải thiện hoạt tính enzym” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính của enzym mã hóa bởi trình tự ORF có đột biến loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin cao hơn hoạt tính của enzym mã hóa bởi trình tự ORF không có đột biến loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung gốc axit amin.

Trong bước (5), khi hoạt tính enzym của protein, mã hóa bởi hai sản phẩm tách dòng PCR khác biệt với nhau về một, hai, hoặc nhiều gốc axit amin trên trình tự axit amin được so sánh với nhau, đột biến axit amin cải thiện hoạt tính enzym dễ dàng được phát hiện. Sau đó, trong bước (6), khi đột biến bazơ để gây đột biến axit amin có thể tiếp tục cải thiện hoạt tính enzym được chèn vào các đoạn ADN chứa trình tự ORF hoặc sản phẩm tách dòng PCR thu được trong bước (2), do đó ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi trình tự ORF được loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung, thì sản xuất được biến thể enzym có hoạt tính được cải thiện. Đột biến thay thế hoặc đột biến tương tự của bazơ để gây đột biến một, hai, hoặc nhiều gốc axit amin có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường.

Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế

Như được thể hiện trong ví dụ 1, các tác giả sáng chế đã tách chiết ADN bộ gen (ADN hệ gen môi trường) của quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng (ví dụ, mẫu nước ở khu vực suối nước nóng và các mẫu môi trường tương tự chứa đất, bùn và màng sinh học có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 80°C) thu thập được từ 5 vị trí ở một khu vực suối nước nóng ở Nhật Bản. Bằng cách sử dụng các ADN hệ gen môi trường này, các tác giả sáng chế đã thực hiện phương pháp điều chế biến thể tự nhiên và thu được xenlobiohydrolaza có độ ổn định nhiệt rất cao.

Cụ thể, từ một ADN hệ gen môi trường đã thu được 13 khung đọc mã mở (Open Reading Frame - ORF) có độ tương đồng trình tự axit amin cao (tức là có độ tương đồng bằng 30% hoặc cao hơn) với enzym xenlobiohydrolaza (cellobiohydrolase - CBH) đã biết. Dựa trên thông tin về trình tự bazơ của các ORF này, đoạn mã được thiết kế và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza được tách dòng từ ADN hệ gen môi trường của hệ vi sinh vật chứa trong đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp PCR. ADN được tách dòng bằng PCR (sản phẩm tách dòng PCR) được biến nạp vào *E. coli* sao cho

protein mã hóa bởi trình tự bazơ này được biểu hiện, quá trình sàng lọc chức năng được thực hiện bằng cách đo hoạt tính phân giải Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric (Phosphoric acid-Swollen Avicel - PSA) và hoạt tính phân giải carboxymetyl xenluloza (Carboxymethyl Cellulose - CMC).

Cuối cùng, từ một khung đọc mã mở AR19G-166, thu được xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt thế hệ mới (xenlobiohydrolaza AR19G-166RA) có hoạt tính phân giải PSA.

Khung đọc mã mở AR19G-166 có trình tự không đầy đủ, trong đó methionin của bộ ba mã hóa khởi đầu bị loại bỏ. Theo đó, gen AR19G-166RA được tách dòng từ ORF này là đoạn gen chỉ chứa vùng xúc tác GH6.

Sau đó, bằng cách sử dụng đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự ORF thu được ở bước (1) này, nấm ADN hệ gen môi trường được tách dòng bằng phương pháp PCR. Kết quả thu được 12 biến thể thay thế axit amin của AR19G-166RA. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế là biến thể AR19G-166RASFS (trong đó, gốc axit amin ở vị trí số 299 là arginin, gốc axit amin ở vị trí số 351 là alanin, gốc axit amin ở vị trí số 88 là serin, gốc axit amin ở vị trí số 230 là phenylalanin, và gốc axit amin ở vị trí số 414 là serin) có độ ổn định nhiệt cao nhất trong số các biến thể của AR19G-166RA. Trình tự axit amin của biến thể AR19G-166QA có tần xuất xuất hiện cao nhất được nêu trong SEQ ID NO: 3, và trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin này được nêu trong SEQ ID NO: 4. Trình tự axit amin của biến thể AR19G-166RASFS được nêu trong SEQ ID NO: 1, và trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin này được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Như được thể hiện trong ví dụ 1, biến thể AR19G-166RASFS có hoạt thủy phân PSA cao. Ngoài ra, biến thể AR19G-166RASFS có hoạt tính phân giải Lichenan chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 hoặc xenluloza tinh thể Avicel, mặc dù hoạt tính này yếu. Ngược lại, biến thể AR19G-166RASFS hầu như không có hoạt tính phân giải CMC hoặc Laminarin chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,6. Ngoài ra, theo kết quả tra cứu trình tự axit amin của biến thể AR19G-166RASFS trên cơ sở dữ liệu đã biết, đã kiểm chứng được rằng trình tự axit amin có độ tương đồng cao nhất chỉ bằng 66% với trình tự axit amin nêu trên là glucosid hydrolaza (SEQ ID NO: 11) thuộc họ GH6 của vi khuẩn ưa nhiệt độ trung bình *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785 thuộc ngành *Chloroflexi*. Các phân tích độ đặc hiệu cơ chất, phân tích HPLC đối với sản phẩm thủy

phân của PSA, và phân tích độ tương đồng của trình tự axit amin này với xenlobiohydrolaza đã biết cho thấy biến thể AR19G-166RASFS là xenlobiohydrolaza mới thuộc họ GH6.

Biến thể AR19G-166RASFS có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5. Cụ thể, như được thể hiện trong phần 9 của ví dụ 1, biến thể AR19G-166RASFS có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 95°C. Hoạt tính xenlobiohydrolaza của biến thể AR19G-166RASFS được biểu hiện bằng cách sử dụng vật chủ *E. coil* chịu được nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 95°C, và độ ổn định nhiệt của biến thể AR19G-166RASFS cao hơn rất nhiều so với độ ổn định nhiệt của biến thể AR19G-166QA và các biến thể thay thế axit amin của AR19G-166QA.

Nhìn chung, đột biến loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin có thể được thực hiện ở protein có hoạt tính sinh lý nhất định mà không làm giảm hoạt tính của nó. Nói cách khác, ở biến thể AR19G-166RASFS, đột biến loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin có thể được thực hiện mà không làm mất hoạt tính xenlobiohydrolaza.

Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza, chứa:

(A) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1

(B) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 (trong đó gốc serin ở vị trí số 88, gốc phenylalanin ở vị trí số 230, và gốc serin ở vị trí số 414 trên trình tự axit amin này, trong đó đột biến loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin chưa xuất hiện, không được đột biến) và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5

(C) polypeptit có trình tự axit amin (tức là trên trình tự axit amin này, vị trí số 88 là serin, vị trí số 230 là phenylalanin, và vị trí số 414 là serin) có độ tương đồng trình tự bằng 85% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5.

Trong polypeptit (B), tốt hơn nếu số lượng gốc axit amin trên trình tự axit amin

như nêu trong SEQ ID NO: 1 được loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung 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.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng trình tự của polypeptit (C) với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 miễn là độ tương đồng này bằng 80% hoặc cao hơn. Tuy nhiên, tốt hơn nếu độ tương đồng này bằng 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu độ tương đồng này bằng 90% hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa nếu độ tương đồng này bằng 95% hoặc cao hơn.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự axit amin được xác định bằng phương pháp sau. Cụ thể, 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 đã biết.

Polypeptit (B) và polypeptit (C) có thể được thiết kế nhân tạo. Theo cách khác, polypeptit (B) và polypeptit (C) có thể là trình tự tương đồng của biến AR19G-166 và các biến thể tương tự hoặc các đoạn protein của chúng.

Mỗi polypeptit từ (A) đến (C) có thể được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo cách khác, các polypeptit này có thể được tổng hợp bằng hệ biểu hiện protein bằng cách sử dụng các polynucleotit theo sáng chế. Hơn nữa, polypeptit (B) và polypeptit (C) có thể được tổng hợp nhân tạo bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen chèn thêm đột biến axit amin, dựa trên polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Các polypeptit từ (A) đến (C) có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5. Các polypeptit này có hoạt tính xenlobiohydrolaza mạnh thậm chí ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C. Do đó, khi enzym chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza là polypeptit bất kỳ từ (A) đến (C), thì có

thể thu được xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt.

Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có cơ chất là PSA. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt này có cơ chất có thể là β glucan khác với PSA. Ví dụ về các cơ chất β glucan khác bao gồm Lichenan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4, xenluloza tinh thể như Avicel, xenluloza vi tinh thể của vi khuẩn (Bacterial Microcrystalline Cellulose - BMCC) và giấy lọc, carboxymetylxenluloza (CMC), glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,6, glucan chứa liên kết β -1,3, glucan chứa liên kết β -1,6, xylan, và các cơ chất tương tự. Tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có cơ chất là PSA và ít nhất một glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 và xenluloza tinh thể, và tốt hơn nữa nếu xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có cơ chất là PSA, glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4, và xenluloza tinh thể.

Độ pH tối ưu của xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5, mặc dù độ pH này thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ phản ứng. Tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở độ pH ít nhất nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5, và tốt hơn nữa nếu ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0.

Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể có hoạt tính thủy phân xenluloza khác với hoạt tính xenlobiohydrolaza. Ví dụ về các hoạt tính thủy phân xenluloza khác bao gồm hoạt tính endoglucanaza, hoạt tính xylanaza, hoạt tính β -glucosidaza và các hoạt tính tương tự.

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

Khi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế chứa vùng khác với vùng xúc tác xenlobiohydrolaza, tốt hơn nếu nó chứa vị trí gắn kết xenluloza. Vị trí gắn kết xenluloza có thể nằm ở phía trước (đầu tận cùng N) hoặc phía sau (đầu tận cùng C) vùng xúc tác xenlobiohydrolaza. Ngoài ra, vị trí gắn kết xenluloza và vùng xúc tác

xenlobiohydrolaza có thể được gắn kết trực tiếp với nhau, hoặc gắn kết với nhau nhờ vùng liên kết có chiều dài thích hợp. Trong xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế, tốt hơn nếu vị trí gắn kết xenluloza nằm phía trước hoặc phía sau vùng xúc tác xenlobiohydrolaza thông qua vùng liên kết, và tốt hơn nữa nếu vị trí gắn kết xenluloza nằm phía trước vùng xúc tác xenlobiohydrolaza thông qua vùng liên kết.

Tốt hơn nếu trong xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế, vị trí gắn kết xenluloza là vùng có khả năng gắn kết với xenluloza, ví dụ, PSA hoặc xenluloza tinh thể, và không có giới hạn cụ thể về trình tự axit amin. Các vị trí gắn kết xenluloza chứa trong các protein đã biết hoặc các vùng thu được bằng cách cải biến thích hợp các vùng nêu trên có thể được sử dụng làm vị trí gắn kết xenluloza. Hơn nữa, khi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có vùng xúc tác xenlobiohydrolaza và vị trí gắn kết xenluloza, tốt hơn nếu các vùng này được liên kết với nhau thông qua trình tự liên kết. Không có giới hạn cụ thể về trình tự axit amin, chiều dài, và các đặc tính tương tự của trình tự liên kết này. Ngoài ra, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể còn chứa peptit tín hiệu được định vị vào vùng đặc hiệu ở tế bào, hoặc peptit tín hiệu được bài tiết ra ngoài tế bào ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Ví dụ về peptit tín hiệu bao gồm peptit tín hiệu vận chuyển không bào, peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất, peptit tín hiệu vận chuyển nhân, peptit tín hiệu bài tiết, và các peptit tín hiệu tương tự. Ví dụ về peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất bao gồm peptit tín hiệu chứa trình tự axit amin của HDEL, và các peptit tương tự.

Ngoài ra, khi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế được sản xuất bằng hệ biểu hiện, để có thể tinh chế enzyme này một cách đơn giản, các trình tự đánh dấu khác nhau có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. 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.

Polynucleotit mã hóa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế

Polynucleotit nêu trên mã hóa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt có thể được tạo ra bằng hệ biểu hiện của vật chủ thu được bằng cách chèn vector biểu hiện chứa polynucleotit này vào vật chủ.

Polynucleotit theo sáng chế mã hóa miền chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza

chứa:

(a) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1

(b) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một gốc axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 (trong đó gốc serin ở vị trí số 88, gốc phenylalanin ở vị trí số 230, và gốc serin ở vị trí số 414 không được đột biến) và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5

(c) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin (tức là trên trình tự axit amin này, vị trí số 88 là serin, vị trí số 230 là phenylalanin, và vị trí số 414 là serin) có độ tương đồng trình tự bằng 85% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5

(d) trình tự bazơ mã hóa polypeptit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 2 và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5

(e) trình tự bazơ mã hóa polypeptit - là trình tự bazơ của polynucleotit được lai hóa với polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 trong điều kiện nghiêm ngặt và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5

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× (thành phần của dung dịch SSC 20×: 3M natri clorua, 0,3M dung dịch axit xitric, độ pH bằng 7,0), dung dịch Denhardt 5x (thành phần dung dịch Denhardt 100x: 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, quá trình lai hóa được thực hiện bằng cách ủ các protein trong vài giờ hoặc qua đêm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 70°C. Sau khi ủ, dung dịch SSC 1× chứa 0,1% khối lượng SDS được ưu tiên sử dụng làm dung dịch đệm rửa, và dung

dịch SSC 0,1× chứa 0,1% khối lượng SDS được ưu tiên hơn.

Trong các trình tự bazơ từ (a) đến (e), tốt hơn nếu để chọn lọc trình tự được sử dụng thường xuyên dưới dạng bộ ba mã hóa của vật chủ là bộ ba mã hóa thoái biến. Ví dụ, trình tự bazơ (a) có thể là trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bazơ thu được bằng cách cải biến trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 thành bộ ba mã hóa mà được sử dụng thường xuyên ở vật chủ mà không làm biến đổi trình tự axit amin cần mã hóa. Sự cải biến bộ ba mã hóa có thể được thực hiện bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết.

Polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được tổng hợp hóa học dựa trên thông tin về trình tự bazơ. Theo cách khác, polynucleotit này có thể được tổng hợp bằng cách phân lập gen mã hóa AR19G-166 có chiều dài đầy đủ (cũng được gọi là “gen AR19G-166”) hoặc một đoạn gen của nó chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza từ tự nhiên bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Ví dụ, gen AR19G-166 có chiều dài đầy đủ hoặc một đoạn gen của nó có thể được tổng hợp từ mẫu chứa các vi sinh vật tự nhiên; và quá trình PCR được thực hiện bằng đoạn xuôi và đoạn ngược được thiết kế dựa trên trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 và sử dụng khuôn là ADN hệ gen môi trường thu được từ mẫu. ADN bổ sung (cADN) được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược bằng cách sử dụng khuôn là ARN thông tin thu được từ mẫu. Hơn nữa, tốt hơn nếu mẫu chứa khuôn axit nucleic được thu thập là mẫu thu được từ môi trường có nhiệt độ cao, như đất ở khu vực có suối nước nóng.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng của trình tự bazơ (d) so với trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2 miễn là nó bằng 80% hoặc cao hơn. Tuy nhiên, tốt hơn nếu độ tương đồng này bằng 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu độ tương đồng này bằng 90% hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa nếu độ tương đồng này bằng 95% hoặc cao hơn.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự bazơ được xác định bằng phương pháp sau. Cụ thể, 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 bazơ được đặt cạnh nhau sao cho các trình tự bazơ tương ứng là giống nhau; và tỷ lệ các trình tự bazơ giống nhau so với tổng số trình tự bazơ 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 bazơ 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 bazơ 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, mỗi polynucleotit có trình tự bazơ (b) hoặc trình tự bazơ (c) có thể được tổng hợp nhân tạo bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một bazơ trên polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, trình tự bazơ (b) hoặc trình tự bazơ (c) có thể là trình tự có chiều dài đầy đủ hoặc một đoạn trình tự gen tương đồng của gen AR19G-166. Gen tương đồng của gen AR19G-166 có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết.

Polynucleotit theo sáng chế có thể chỉ có miền mã hóa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza. Theo cách khác, polynucleotit này có thể có các miền mã hóa vị trí gắn kết xenluloza, trình tự liên kết, các peptit tín hiệu khác nhau, các trình tự đánh dấu khác nhau, và các vùng tương tự, ngoài miền nêu trên.

Vector biểu hiện theo sáng chế

Vector nêu trên là vector chứa polynucleotit theo sáng chế và biểu hiện polypeptit có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở tế bào vật chủ ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 80°C và độ pH bằng 5,5. Cụ thể, vector này là vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế. Cụ thể, catxet biểu hiện chứa ADN có trình tự vùng khởi đầu, polynucleotit theo sáng chế, và ADN có trình tự vùng kết thúc nằm phía trước, cần được biến nạp vào vector biểu hiện. Polynucleotit theo sáng chế có thể được biến nạp vào vector biểu hiện này bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết, và kit tổng hợp vector biểu hiện có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể được chèn vào tế bào nhân sơ như *E. coli* hoặc tế bào nhân thực như nấm men, nấm sợi, tế bào dịch hại, tế bào động vật có vú, và tế bào thực vật. Vector bất kỳ tương thích với vật chủ có thể được sử dụng làm vector biểu hiện theo sáng chế.

Vector biểu hiện theo sáng chế không bị giới hạn bởi polynucleotit theo sáng chế, và tốt hơn nếu vector này mang gen kháng thuốc hoặc gen tương tự. Khi vector biểu hiện theo sáng chế mang gen kháng thuốc, thì có thể dễ dàng chọn lọc được vật chủ đã chuyển gen và vật chủ chưa chuyển gen.

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

Thế biến nạp theo sáng chế

Thế biến nạp nêu trên chứa vector biểu hiện theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể được biểu hiện ở thế biến nạp này. Xenlobiohydrolaza đã biết trong lĩnh vực này chỉ được biểu hiện ở một vài vật chủ. Cụ thể, không dễ biểu hiện được nhiều xenlobiohydrolaza ở các tế bào vật chủ khác nhau. Ngược lại, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể được biểu hiện ở nhiều tế bào như *E. coli*, nấm men, nấm sợi, và lục lạp của thực vật bậc cao. Cụ thể, thế biến nạp theo sáng chế bao gồm *E. coli*, nấm men, nấm sợi, lục lạp của thực vật bậc cao, và vật chủ tương tự, chứa vector biểu hiện theo sáng chế.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp sản xuất thế biến nạp theo sáng chế bằng cách sử dụng vector biểu hiện. 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 chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*, phương pháp súng hạt, phương pháp xung điện, phương pháp chuyển gen nhờ polyetylen glycol (PEG), và phương pháp tương tự. 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*.

Theo khía cạnh khác, vật chủ mang vector biểu hiện này có thể là tế bào nhân sơ như *E. coli* hoặc tế bào nhân thực như nấm men, nấm sợi, tế bào dịch hại, tế bào động vật có vú, và tế bào thực vật. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sản xuất một cách đơn giản hơn bằng cách nuôi cấy thế biến nạp *E. coli*. Đồng thời, protein được glycosyl hóa ở tế bào nhân thực. Do đó, khi thế biến nạp theo sáng chế là tế bào nhân thực, sẽ thu được xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt có độ ổn định nhiệt rất cao so với khi thế biến nạp là tế bào nhân sơ. Đặc biệt, khi thế biến nạp theo sáng chế là vi sinh vật nhân thực như nấm sợi như *Aspergillus* hoặc nấm men, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt có độ ổn định nhiệt rất cao có thể được sản xuất một cách tương đối đơn giản.

Khi tế bào nhân sơ, nấm men, nấm sợi, tế bào dịch hại, tế bào động vật có vú, và 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 vật chủ chưa chuyển gen.

Khi thể biến nạp theo sáng chế là thực vật, tế bào nuôi cấy thực vật, cơ quan thực vật hoặc mô thực vật có thể được sử dụng làm vật chủ. Thực vật chuyển gen có thể được tạo ra từ tế bào thực vật chuyển gen, mô sẹo, và các cơ quan tương tự bằng phương pháp nuôi cấy mô thực vật đã biết và các phương pháp tương tự. Ví dụ, khi tế bào thực vật chuyển gen được nuôi cấy bằng môi trường tái biệt hóa không chứa hormon, và cây con thu được đã ra rễ được trồng vào đất hoặc môi trường tương tự và sinh trưởng, có thể thu được thực vật chuyển gen.

Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế

Phương pháp nêu trên là phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt trong thể biến nạp theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện liên tục trong thể biến nạp được tạo ra bằng vector biểu hiện chứa polynucleotit theo sáng chế được biến nạp vào phía trước vùng khởi đầu không có khả năng điều khiển thời điểm biểu hiện hoặc yếu tố tương tự. Ngược lại, khi thể biến nạp được tạo ra bằng vùng khởi đầu cảm ứng biểu hiện phụ thuộc vào hợp chất cụ thể, điều kiện nhiệt độ, và yếu tố tương tự được cảm ứng trong điều kiện biểu hiện tương ứng, thì xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt được biểu hiện trong thể biến nạp này.

Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt sản xuất bằng thể biến nạp theo sáng chế có thể được sử dụng ở trạng thái nằm trong thể biến nạp này hoặc được chiết xuất hoặc tinh chế từ thể biến nạp này.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp chiết xuất và tinh chế xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt từ thể biến nạp theo sáng chế miễn là phương pháp này không làm giảm hoạt tính của xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có thể được chiết xuất bằng phương pháp chiết xuất polypeptit từ tế bào hoặc mô sinh học thông thường. Ví dụ về phương pháp chiết xuất bao gồm bước ngâm thể biến nạp vào dung dịch đệm thích hợp, chiết xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt, sau đó phân tách hỗn hợp chiết xuất thành dịch chiết enzym và cặn rắn. Tốt hơn nếu dung dịch đệm chiết xuất chứa chất làm tăng độ tan, như chất hoạt động bề mặt. Khi thể biến nạp theo sáng chế là thực vật, thì thể biến nạp này có thể được cắt nhỏ hoặc nghiền nhỏ trước khi ngâm vào dung dịch đệm. Hơn nữa, các phương pháp phân tách rắn-lỏng đã biết, như phương pháp lọc, phương pháp lọc nén, và phương pháp ly tâm có thể được sử dụng để phân tách hỗn hợp chiết xuất thành dịch

chiết enzym và cặn rắn. Ngoài ra, thể biến nạp đang được ngâm trong dung dịch đậm có thể được ép. Xenlobiohydrolaza siêu 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, và phương pháp sắc ký.

Khi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện ở trạng thái có peptit tín hiệu bài tiết trong thể biến nạp, thì có thể thu được dung dịch chứa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt một cách đơn giản bằng cách nuôi cấy thể biến nạp này, sau đó thu phần dịch nổi không chứa thể biến nạp từ canh trường nuôi cấy. Ngoài ra, khi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế có trình tự đánh dấu, như trình tự đánh dấu His, xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt trong dịch chiết hoặc phần dịch nổi có thể được tinh chế một cách đơn giản bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng trình tự đánh dấu.

Hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế

Hỗn hợp xenlulaza nêu trên chứa xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế hoặc xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế và ít nhất một loại xenlulaza khác. Xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt được sản xuất theo phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu 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 xenlulaza theo sáng chế được sử dụng để phân giải xenluloza, thì có thể phân giải hiệu quả lignoxenluloza..

Không có giới hạn cụ thể về xenlulaza khác với xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế miễn là nó có hoạt tính thủy phân xenluloza. Ví dụ về xenlulaza khác bao gồm hemixenlulaza, như xylanaza hoặc β -xylosidaza, β -glucosidaza, endoglucanaza, và enzym tương tự. Tốt hơn nếu hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chứa ít nhất một hemixenlulaza và endoglucanaza và tốt hơn nữa nếu hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chứa cả hemixenlulaza và endoglucanaza. Đặc biệt, tốt hơn nếu hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chứa ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm xylanaza, β -xylosidaza, β -glucosidaza, và endoglucanaza, và tốt hơn nữa nếu chứa hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế toàn bộ xylanaza, β -xylosidaza, β -glucosidaza, và endoglucanaza.

Tốt hơn nếu xenlulaza khác chứa trong hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế là xenlulaza bền nhiệt có hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ ít nhất bằng 70°C, và tốt hơn nữa nếu enzyme này là xenlulaza bền nhiệt có hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ ít nhất nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C. Khi hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chứa toàn bộ các enzyme có tính kháng nhiệt, thì có thể thực hiện hiệu quả phản ứng phân giải xenluloza bằng hỗn hợp xenlulaza này ở điều kiện nhiệt độ cao. Cụ thể, khi hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chỉ chứa xenlulaza bền nhiệt được sử dụng để thủy phân lignoxenluloza, thì có thể thực hiện phản ứng thủy phân lignoxenluloza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C. Khi quá trình thủy phân được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ cao, thì lượng enzyme, thời gian thủy phân và chi phí cho phản ứng thủy phân có thể giảm.

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

Phương pháp này là phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế. Cụ thể, sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế được sản xuất bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt, thể biến nạp, hoặc xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế.

Thuật ngữ “sản phẩm phân giải xenluloza” được dùng trong bản mô tả để chỉ xenlo-oligosacarit chứa chủ yếu xenlobioza, xenlotrioza và các hợp chất tương tự.

Không có giới hạn cụ thể về nguyên liệu chứa xenluloza miễn là nó chứa xenluloza. Ví dụ về nguyên liệu chứa xenluloza bao gồm sinh khối xenluloza như cỏ dại, chất thải nông nghiệp, giấy thải, và nguyên liệu tương tự. Trước khi tiếp xúc với xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế, tốt hơn nếu nguyên liệu chứa xenluloza được xử lý vật lý, như cắt nhỏ hoặc băm nhỏ và xử lý hóa học bằng axit, kiềm, và hợp chất tương tự, ngâm vào dung dịch đệm thích hợp, hoặc xử lý phân giải.

Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza bởi xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế được thực hiện ở điều kiện mà ở đó xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt này có hoạt tính. Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 7,0, và tốt hơn nữa nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Thời gian phản

ứng thủy phân xenluloza được điều chỉnh thích hợp theo loại nguyên liệu chứa xenluloza 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 xenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 10 phút đến 100 giờ. Khi phân giải sinh khối xenluloza, thì phản ứng thủy phân xenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 1 giờ đến 100 giờ.

Để thủy phân xenluloza, thì ngoài xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế tốt hơn nếu sử dụng ít nhất một xenlulaza khác. Các xenlulaza khác nêu trên, xenlulaza chứa trong hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế có thể được sử dụng, và tốt hơn nếu xenlulaza này là bền nhiệt và có hoạt tính ở nhiệt độ ít nhất bằng 70°C và tốt hơn nữa nếu ở điều kiện nhiệt độ ít nhất nằm trong khoảng từ 70°C đến 100°C. Ngoài ra, trong phương pháp này, thể biến nạp hoặc xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế, hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế có thể được sử dụng thay cho xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ sau, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Quy trình tách dòng xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt từ mẫu đất ở khu vực suối nước nóng

1. Tổng hợp ADN hệ gen môi trường từ mẫu đất có nhiệt độ cao

Mẫu nước chứa đất, bùn và sinh khối được thu nhận từ khu vực suối nước nóng ở Nhật Bản. Các mẫu này có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 33°C đến 78°C và độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 8. Trong số các mẫu đất thu được ở khu vực suối nước nóng, năm mẫu được ký hiệu lần lượt là AR19, OJS2, OJS4, OJS7, và OJS9 khi ADN hệ gen môi trường của các mẫu được tách chiết. ADN được chiết tách bằng kit chiết tách ADN từ 10g mỗi mẫu đất thu được ở khu vực suối nước nóng (ISOIL Large for Beads ver. 2, NIPPON GENE CO., LTD.). ADN được tách chiết với lượng bằng 10µg hoặc cao hơn từ mẫu đất AR19 và quá trình giải trình tự bộ gen được thực hiện trên 5µg ADN thu được bằng hệ thống GS FLX Titan 454 do Roche Diagnostics sản xuất. Lượng ADN còn lại

được sử dụng để tách dòng gen mã hóa xenulaza bằng phương pháp PCR. Đồng thời, các mẫu có lượng ADN thu được bằng 10µg hoặc nhỏ hơn được khuếch đại bằng kit khuếch đại ADN bộ gen (Kit khuếch đại ADN GenomiPhi V2, do GE Healthcare sản xuất).

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

Quá trình giải trình tự hàng loạt được thực hiện ba lần bằng hệ thống 454 GS FLX Titan do Roche sản xuất từ ADN hệ gen môi trường được tách chiết từ mẫu đất AR19 thu được ở khu vực suối nước nóng. Dữ liệu đầu ra (tệp tin sff) của hệ thống Roche 454 được xử lý đệm bằng phần mềm PyroBayes (Quinlan và cộng sự, Nature Methods, 2008, vol. 5, p. 179-81.) để thu được các tệp trình tự định dạng FASTA và tệp có chất lượng. Các đầu của trình tự đọc thu được được cắt bỏ để cải thiện chất lượng của chúng, và các trình tự đọc được lắp ráp bằng phần mềm Newbler phiên bản 2.3 của 454 Life Science. Quá trình lắp ráp được thực hiện trong các điều kiện: “độ trùng lặp tối thiểu chấp nhận được (mi) = 0,9”, “tùy chọn: - lớn (đối với các bộ gen có kích cỡ lớn hoặc phức tạp, tăng tốc độ lắp ráp, nhưng làm giảm độ chính xác.)”.

Các đoạn trình tự đọc được sàng lọc chất lượng và các đoạn tiếp giáp đã được lắp ráp (chiều dài bằng 100bp hoặc cao hơn) có tổng chiều dài bằng 330Mbp và bộ dữ liệu này được sử dụng để phân tích gen mã hóa xenulaza. Trong tổng số 2766332 đoạn trình tự đọc, 2040651 đoạn trình tự đọc được lắp ráp thành 101372 đoạn tiếp giáp có chiều dài trung bình bằng 1027bp hoặc cao hơn, và đoạn tiếp giáp lớn nhất có chiều dài bằng 187970bp.

Đối với các trình tự đã được lắp ráp, toàn bộ các đoạn tiếp giáp và các đoạn duy nhất được phân loại thành năm loài bao gồm vi khuẩn, vi khuẩn cổ, sinh vật nhân sơ, virus, và nhóm không thuộc các loài này, tham khảo cơ sở dữ liệu KEGG (Kanehisa, M. Science & Technology Japan, 1996, No. 59, p. 34-38, <http://www.genome.jp/kegg/>, 11/5/2011). Trong trình tự đã được lắp ráp có chiều dài bằng 330Mbp (= tổng chiều dài các đoạn tiếp giáp + tổng chiều dài đoạn duy nhất), chiều dài trình tự của vi khuẩn bằng 59,9Mbp, chiều dài trình tự của vi khuẩn cổ bằng 3,1Mbp, chiều dài trình tự của sinh vật nhân sơ bằng 25499bp, và chiều dài trình tự của virus bằng 384255bp. Các kết quả này cho thấy cơ sở dữ liệu gen cải biến chỉ chứa 19,2% trình tự ADN đã biết. Chiều dài trình tự của nhóm không thuộc các loài nêu trên bằng 266,7Mbp và chiếm 80,8% toàn bộ trình

tự đã được lắp ráp. Các trình tự này là trình tự thể hệ mới thu được từ vi khuẩn, vi khuẩn cổ, và sinh vật nhân sơ.

3. Quá trình phát hiện khung đọc mã mở (ORF) của xenlobiohydrolaza

Các trình tự có mã phân loại enzym 3.2.1.4 (xenlulaza), 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/>, số truy cập: 2009/4/13), và cơ sở dữ liệu về các gen mã hóa glycosit hydrolaza được thiết kế. Khung đọc mã mở được phát hiện từ các trình tự tiếp giáp thu được ở phần 2 bằng phần mềm Orphelia (Hoff và cộng sự, Nucleic Acids Research, 2009, 37 (Web Server issue: W101-W105, tùy chọn Orphelia: mặc định (model = Net 700, độ trùng lặp tối đa = 60)). Gen mã hóa glycosit hydrolaza được xác định từ trình ORF phát hiện được bằng phần mềm BLASTP (blastall phiên bản 2.2.18) và tham khảo cơ sở dữ liệu cục bộ. Điều kiện tùy chọn của phần mềm BLASTP được cài đặt như sau: “trình tự truy vấn = sai”, “trị số kỳ vọng (E) < $1e^{-20}$ ”, “trị số mặc định - 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, cỡ chữ = mặc định”, và các trình tự mục đích được thu thập là gen mã hóa glycosit hydrolaza.

Các glycosit hydrolaza, như xenlulaza, endohemixenlulaza, và các enzym cắt mạch nhánh thu được bằng phương pháp nêu trên được phân loại chức năng bằng phần mềm pfam HMMs (Pfam phiên bản 23.0 và HMMER v 2.3 Finn và cộng sự, 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, các trình tự 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 và cộng sự, “*The theory behind profile HMMs. Biological sequence analysis: probabilistic models of protein and nucleic acids*”, 1998, Cambridge University Press.; hmmpfam (Ver. 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)) sử dụng mô hình ẩn Markov.

4. Quá trình tách dòng AR19G-166RA và AR19G-166QV

13 ORF chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza thuộc họ GH6, GH9, GH48, và các

họ GH khác được phát hiện từ biến thể AR19 thu được từ mẫu đất ở khu vực suối nước nóng. Các đoạn môi được thiết kế dựa trên ORF này, và các gen này được tách dòng từ biến thể AR19 thu được từ mẫu đất ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp PCR. Các gen mã hóa xenlobiohydrolaza (AR19G-166RA và AR19G-166QV) thuộc họ GH6 được tách dòng từ khung đọc mã mở AR19G-166.

5. Khung đọc mã mở AR19G-166

Khung đọc mã mở AR19G-166 mã hóa polypeptit (SEQ ID NO.5) chứa 474 gốc axit amin. Tuy nhiên, khung đọc mã mở AR19G-166 có trình tự không đầy đủ, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu bị mất, và chỉ chứa một phần trình tự liên kết và vùng xúc tác GH6. Vùng xúc tác GH6 của AR19G-166 được tách dòng vào các gen AR19G-166RA và AR19G-166QV bằng phương pháp PCR, và có độ tương đồng trình tự axit amin bằng 66% với glycosit hydrolaza thuộc họ GH6 (Genbank: ABX 04776.1) của vi khuẩn ưa nhiệt độ trung bình *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785 thuộc ngành *Chloroflexi*. Hai sản phẩm tách dòng gen (AR19G-166RA và AR19G-166QV) thu được từ biến thể AR19G-166 bằng phương pháp PCR sử dụng đoạn môi xuôi chứa trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.7 (5'-CACCATGTTGGACAATCCATTCATCGGAG-3'): thu được bằng cách bổ sung 7 bazơ (CACCATG) vào đầu tận cùng 5' của trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.6; trong trình tự đã bổ sung, ATG ở đầu 3' là bộ ba mã hóa khởi đầu, và CACC ở đầu 5' là trình tự để chèn vào vector) và môi ngược chứa trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.8 (5'-TTAGGGTTGGATCGGCGGATAG-3'). Trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166RA và AR19G-166QV chỉ khác nhau về gốc axit amin ở hai vị trí số 299 và vị trí số 351. Ở biến thể AR19G-166RA, gốc axit amin ở vị trí số 299 là arginin, và gốc axit amin ở vị trí số 351 là alanin. Ở biến thể AR19G-166QV, gốc axit amin ở vị trí số 299 là glutamin, và gốc axit amin ở vị trí số 351 là valin.

6. Quá trình tách dòng biến thể tự nhiên bằng phương pháp PCR

Các gen mã hóa xenlobiohydrolaza của năm ADN hệ gen môi trường nêu trên (AR19, OJS2, OJS4, OJS7, và OJS9) được tách dòng PCR bằng cách sử dụng môi xuôi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 7 và môi ngược có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO: 8. Trình tự của các sản phẩm tách dòng mục đích được xác định bằng máy giải trình tự Sanger. Kiểu gen và đột biến axit amin của mỗi dòng được thể hiện trong bảng 1 và bảng 2. Tổng cộng thu được 46 dòng biến thể tự nhiên có số lượng lớn SNP

bằng cách thực hiện tách dòng PCR trên nhiều mẫu ADN hệ gen môi trường. Các biến thể này có số lượng SNP ở tổng cộng 27 vị trí bao gồm c6t, g51a, a69g, a201g, c259t, c433t, c450t, g456c, c531t, a627g, a896g, c1116t, c98t (A33V), t251c (I84T), c262t (P88S), g497a (R166H), c683t (T228I), c688t (L230F), a762t (E254D), a761g (E254G), c805t (R269C), a896g (R299Q), a916g (S306G), c1052t (A351V), a1078g (E360K), g1216a (A406T), và t1241c (F414S) (SNP được thể hiện bằng các chữ cái thường, và các chữ cái trong ngoặc đơn thể hiện đột biến thay thế axit amin do SNP). SNP gây đột biến thay thế axit amin ở 14 vị trí trong số 27 vị trí (bảng 1 và bảng 2). Ở toàn bộ các sản phẩm tách dòng có SNP, không quan sát thấy đột biến IN/DEL (đột biến chèn thêm và loại bỏ trình tự bazơ ADN).

Bảng 1

	Mẫu ADN hệ gen môi trường					
	AR19	OJS2	OJS4	OJS5	OJS9	Tổng cộng
Tổng số sản phẩm tách dòng được khuếch đại bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc	240	48	48	48	48	432
Các sản phẩm tách dòng mục đích						
QA (Q299/A351)	18	3	4	3	1	29
QV (Q299/V351)	1	0	0	0	0	1
RA (R299/A351)	4	0	0	0	0	4
QA/A33V	2	0	0	0	0	2
QA/T228I	0	0	1	0	0	1
QA/R269C	1	0	0	0	0	1
QA/E254G	0	0	0	1	0	1
QA/S306G	2	0	0	0	0	2
QA/R166H/E360K	0	0	1	0	0	1
QA/I84T/A406T	0	0	0	1	0	1
RA/E254D	1	0	0	0	0	1
RA/P88S/L230F/F414S	0	2	0	0	0	2
Tổng số các sản phẩm tách dòng mục đích	29	5	6	5	1	46

Bảng 2

Các biến thể tách dòng	SNP và các đột biến thay thế axit amin
Các sản phẩm tách dòng QA	c6t, a201g, c259t, c450t, g456c, c531t, a627g
QV	c1052t (A351V)
RA	a51g, a201g, a896g (Q299R)

QA/A33V	c98t (A33V)
QA/T228I	a201g, c433t, c683t(T228I), c1116t
QA/R269C	c805t (R269C)
QA/E254G	a201g, a761g (E254G)
QA/S306G	a69g, a916g (S306G)
QA/R166H/E360K	a201g, g497a (R166H), a1078a (E360K)
QA/I84T/A406T	a201g, 251c (I84Tt), g1216a (A406T)
RA/E254D	a51g, a201g, a762t (E254D), a896g (Q299R)
RA/P88S/L230F/F414S	a201g, c262t (P88S), c688t (L230F), a896g (Q299R), t1241c (F414S)

Trong số 46 sản phẩm tách dòng thu được, 29 sản phẩm tách dòng là biến thể AR19G-166QA (viết tắt là “QA”, SEQ ID NO.3) mã hóa trình tự axit amin, trong đó gốc axit amin ở vị trí số 299 là glutamin và gốc axit amin ở vị trí số 351 là alanin; 1 sản phẩm tách dòng là biến thể AR19G-166QV (viết tắt là “QV”, SEQ ID NO.9) mã hóa trình tự axit amin, trong đó gốc axit amin ở vị trí số 299 là glutamin và gốc axit amin ở vị trí số 351 là valin; và 4 sản phẩm tách dòng là biến thể AR19G-166RA (viết tắt là “RA”, SEQ ID NO.10) mã hóa trình tự axit amin, trong đó gốc axit amin ở vị trí số 299 là arginin và gốc axit amin ở vị trí số 351 là alanin (Bảng 1).

Mười hai sản phẩm tách dòng khác là biến thể được tạo ra bằng cách đột biến từ 1 đến 3 gốc axit amin ở QA, RA, hoặc OV. Trong số 12 sản phẩm tách dòng này, 9 sản phẩm tách dòng là biến thể được tạo ra bằng cách thay thế từ 1 đến 2 gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166QA (Bảng 1). 9 sản phẩm tách dòng bao gồm 2 sản phẩm tách dòng QA/A33V, trong đó alanin ở vị trí số 33 được thay thế bằng valin; 1 sản phẩm tách dòng QA/T228I, trong đó threonin ở vị trí số 228 được thay thế bằng isoleucin; 1 sản phẩm tách dòng QA/R269C, trong đó arginin ở vị trí số 269 được thay thế bằng xystein; 1 sản phẩm tách dòng QA/E254G, trong đó axit glutamic ở vị trí số 254 được thay thế bằng glyxin; 2 sản phẩm tách dòng QA/S306G, trong đó serin ở vị trí số 306 được thay thế bằng glyxin; 1 sản phẩm tách dòng QA/R166H/E360K, trong đó arginin ở vị trí số 166 và axit glutamic ở vị trí số 360 được thay thế lần lượt bằng histidin và glyxin; và 1 sản phẩm tách dòng QA/I84T/A406T, trong đó isoleucin ở vị trí số 84 và alanin ở vị trí số 406 được thay thế bằng threnonin.

Ba sản phẩm tách dòng khác là biến thể được tạo ra bằng cách thay thế từ 1 đến 3 gốc axit amin trên trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166RA. Các sản phẩm tách dòng này bao gồm 1 sản phẩm tách dòng RA/E254D, trong đó axit glutamic ở vị trí số 254

được thay thế bằng axit aspartic; và 2 sản phẩm tách dòng RA/P88S/L230F/F414S (cũng được gọi là “AR19G-166RASFS”, SEQ ID NO: 1), trong đó prolin ở vị trí số 88, leucin ở vị trí số 230, và phenylalanin ở vị trí số 414 được thay thế lần lượt bằng serin, phenylalanin, và serin.

Fig.1 thể hiện sự sắp thẳng hàng của các gốc axit amin mã hóa bởi AR19G-166RA, AR19G-166QV, AR19G-166QA, và AR19G-166RASFS. Bốn loại gen này là gen được tách dòng từ 5 mẫu AND thu được từ quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cùng cặp đoạn mồi. Trên Fig.1, ký hiệu “.” thể hiện gốc axit amin giống nhau, và gốc axit amin được thay thế như được thể hiện bằng các chữ cái màu trắng.

Biến thể AR19G-166QA là dòng có tần xuất xuất hiện cao nhất, và tổng cộng 29 sản phẩm tách dòng AR19G-166QA thu được từ 5 loại ADN hệ gen môi trường (Bảng 2). 29 sản phẩm tách dòng AR19G-166QA chứa các SNP ở 7 vị trí (c6t, a201g, c259t, c450t, g456t, c531t, và a627g) trên trình tự bazơ.

Không như các gen AR19G-166QA, trình tự bazơ của gen AR19G-166RA chứa các SNP ở ba vị trí (a51g, a201g, và a896g) (Bảng 2). Trong số đó, hai vị trí là đột biến lặn, và guanin ở cả vị trí số 51 và vị trí số 201 của trình tự bazơ này được thay thế bằng adenin. Một vị trí còn lại là SNP tham gia vào đột biến thay thế axit amin, và adenin ở vị trí số 896 được đột biến thành guanin. Do SNP, ở biến thể AR19G-166RA, gốc axit amin ở vị trí số 299 trên trình tự axit amin được thay thế bằng arginin.

Trình tự bazơ của gen AR19G-166QV chứa SNP ở một vị trí (Bảng 2). Trong trình tự bazơ này, xytosin ở vị trí số 1052 được đột biến thành thymin. Do đó, ở biến thể AR19G-166QV, gốc axit amin ở vị trí số 351 của trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166QA được thay thế bằng valin.

Trong số 12 biến thể AR19G-166SNP, AR19G-166RASFS có độ ổn định nhiệt cao nhất chứa SNP ở 5 vị trí (a201g, c262t (P88S), c688t (L230F), a896g (Q299R), và t1241c (F414S)) không như AR19G-166QA (Bảng 2). Trong số đó, 4 vị trí tham gia vào đột biến thay thế axit amin. Ở một trong số 4 vị trí này, adenin ở vị trí số 896 được đột biến thành guanin tương tự như AR19G-166RA, và gốc axit amin ở vị trí số 299 trên trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166RASFS được thay thế bằng arginin. Ở ba vị trí còn lại,

xytosin ở vị trí số 262 được đột biến thành thymin, xytosin ở vị trí số 688 được đột biến thành thymin, và thymin ở vị trí số 1241 được đột biến thành xytosin. Do SNP, trên trình tự axit amin mã hóa bởi AR19G-166RASFS, prolin ở vị trí số 88 được thay thế bằng serin, leucin ở vị trí số 230 được thay thế bằng phenylalanin, và phenylalanin ở vị trí số 414 được thay thế bằng serin.

7. Quá trình biểu hiện và tinh chế biến thể tự nhiên có đột biến thay thế axit amin

Các plasmit thu được bằng quá trình tách dòng PCR được biến nạp vào chủng *E. coli* Rosetta-gamiB (DE3) pLysS (do Merck & Co., Inc sản xuất) để biểu hiện protein bằng phương pháp sốc nhiệt. *E. coli* có các gen mục đích được cấy vào môi trường LB chứa ampicillin ở nồng độ bằng 100mg/L và nuôi cấy cho đến khi mật độ quang OD_{600nm} nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,8. Sau đó, IPTG (isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyrandosit) được bổ sung vào, và vi khuẩn này được nuôi cấy trong 20 giờ để biểu hiện các protein mục đích. Sau khi nuôi cấy, *E. coli* được thu nhận bằng ly tâm, và dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH bằng 5,5) có thể tích bằng 1/20 thể tích dịch nuôi cấy được bổ sung vào để tạo hỗn dịch vi khuẩn. Sau đó, hỗn hợp thu được được phân cắt trong 30 giây bằng thiết bị phân cắt bằng siêu âm BioRuptor UCD-200T (do COSMO BIO CO., LTD. sản xuất), tiếp đó quá trình phân cắt được dừng trong 30 giây. Quá trình xử lý này được lặp lại 10 lần để thu được phần dịch nổi chứa các protein mục đích có đột biến thay thế axit amin. Phần dịch nổi này được sử dụng làm dung dịch mẫu enzym.

Các protein mục đích trong dung dịch mẫu enzym được kiểm chứng bằng phân tích điện di trên gel SDS-PAGE. Fig.2 thể hiện các kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE của protein enzym xenlobiohydrolaza mã hóa bởi các biến thể tự nhiên chứa các gen AR19G-166 (nhuộm màu bằng thuốc thử CBB).

Cột trao đổi ion HiTrap Q HP (do GE Healthcare sản xuất) được làm cân bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) được nạp với dung dịch mẫu enzym. Sau đó, các protein được phân đoạn ở gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 50% bằng hệ thống môi trường/máy sắc ký lỏng hiệu năng cao AKTA (do GE Healthcare sản xuất) và dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) chứa 1M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được trộn với nhau, sau đó dung dịch thu được được trao đổi với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) chứa 750mM amoni sulfat bằng màng siêu lọc ly tâm VIVASPIN 20 (do Sartorius Stedim Biotech sản xuất). Sau đó, cột

phân tách tương tác kỵ nước HiTrap Phenyyl HP (do GE Healthcare sản xuất) được làm cân bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) được nạp với phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza đã được trao đổi bằng màng siêu lọc ly tâm, và các protein được phân tách ở gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 100% đến 0% bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0). Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được trộn với nhau, sau đó cô bằng thiết bị VIVASPIN 20 đến thể tích bằng 8mL. Mẫu đã cô được nạp vào cột lọc gel Hiload 26/60 superdex 200pg (do GE Healthcare sản xuất) được làm cân bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) chứa 150mM NaCl, và quá trình phân đoạn được thực hiện bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0) với thể tích gấp từ 1 đến 1,5 lần thể tích cột và tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 2mL/phút đến 3mL/phút. Sau đó, các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được trộn với nhau, dung dịch thu được được trao đổi với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH bằng 8,0, ly tâm để thu được dung dịch mẫu enzym tinh khiết có nồng độ cuối cùng bằng khoảng 1mg/mL.

8. Đo hoạt tính xenlobiohydrolaza bằng cơ chất PSA (hoạt tính thủy phân PSA)

Cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric (phosphoric acid-swollen Avicel - PSA) được sử dụng để đo hoạt tính xenlobiohydrolaza. PSA được điều chế bằng cách hòa tan bột Avicel (bột xenluloza tinh thể mịn, do Merck & Co., Inc sản xuất) vào dung dịch axit phosphoric; nước cất vô khuẩn được bổ sung vào để kết tủa các tinh thể, và các tinh thể này được rửa cho đến khi độ pH của chúng bằng 5,0 hoặc cao hơn. Toàn bộ PSA được sử dụng trong thử nghiệm dưới đây được điều chế theo phương pháp này.

Dung dịch phản ứng để đo hoạt tính thủy phân PSA chứa dung dịch PSA có nồng độ cuối cùng bằng 0,5%, 50mM dung dịch đệm axetat (độ pH bằng 5,5), và dung dịch mẫu enzym (được điều chế theo phần 7) được pha loãng thích hợp. Dung dịch này được để phản ứng trong 20 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C. Sau khi phản ứng kết thúc, lượng gốc đường khử được thủy phân bằng thuốc thử axit 3,5-đinitrosalicylic (DNSA) được định lượng bằng máy quang phổ (540nm), và lượng đường khử được xác định bằng đường chuẩn được xây dựng bằng glucoza chuẩn. Sau đó, từ sự khác biệt về lượng chất giữa mẫu đối chứng và mẫu thử nghiệm, lượng đường khử được tạo ra bởi quá trình thủy phân của enzym được xác định. Lượng đường khử tối đa được tính bằng 100, và lượng đường khử ở mỗi nhiệt độ được vẽ đồ thị dưới dạng trị số

tương đối.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA. Toàn bộ các biến thể có đột biến thay thế axit amin của gen mã hóa xenlobiohydrolaza AR19G-166 được tách dòng từ ADN hệ gen môi trường của quần thể vi sinh vật có mặt trong đất có nhiệt độ cao, có hoạt tính thủy phân PSA. Nhiệt độ tối ưu của các biến thể có đột biến thay thế axit amin của AR19G-166QV và AR19G-166QA là nhỏ hơn nhiệt độ tối ưu của AR19G-166RA và các biến thể có đột biến thay thế axit amin của AR19G-166RA. Ở biến thể QA/T228I, $T_{\text{tối ưu}} = 80^{\circ}\text{C}$; ở QA/S306G, $T_{\text{tối ưu}} = 70^{\circ}\text{C}$; và ở các biến thể có đột biến thay thế axit amin còn lại của AR19G-166QA, $T_{\text{tối ưu}} = 75^{\circ}\text{C}$. Ngược lại, ở biến thể AR19G-166RA và biến thể có đột biến thay thế axit amin của nó RA/E254D, $T_{\text{tối ưu}} = 80^{\circ}\text{C}$; và ở biến thể có đột biến thay thế axit amin AR19G-166RASFS của AR19G-166RA, $T_{\text{tối ưu}} > 90^{\circ}\text{C}$.

Nhiều biến thể không có hoạt tính được tạo ra trong phương pháp đột biến nhân tạo DE, do đó trong nhiều trường hợp không cần đo hoạt tính của chúng. Tuy nhiên, toàn bộ các biến thể được tách dòng bằng phương pháp điều chế biến thể tự nhiên theo sáng chế có hoạt tính enzym, và xenlobiohydrolaza AR19G-166RASFS có độ ổn định nhiệt bằng 15°C hoặc cao hơn thu được từ thư viện biến thể chứa tương đối ít các sản phẩm tách dòng.

9. Xác định các đặc tính enzym

Các protein enzym của biến thể AR19G-166RASFS mà đã kiểm chứng được là có nhiệt độ tối ưu cao nhất trong thử nghiệm đo hoạt tính thủy phân PSA và được tạo ra bằng cách thay thế ba axit amin (P88S/L230F/F414S) của AR19G-166RA, được tinh chế, và độ đặc hiệu cơ chất, đặc tính độ pH, đặc tính nhiệt độ (nhiệt độ tối ưu và độ ổn định nhiệt), đặc tính enzym của nó được xác định.

Độ đặc hiệu cơ chất

Độ đặc hiệu cơ chất của biến thể AR19G-166RASFS được xác định bằng cách sử dụng bột Avicel, carboxymetyl xenluloza (CMC, do Sigma-Aldrich Co, LLC. sản xuất), xylan (từ gỗ sồi, do Sigma-Aldrich Co, LLC. sản xuất), Lichenan (do MP Biomedicals, LLC. sản xuất), và Laminarin (từ *Laminaria digitata*, do Sigma-Aldrich Co, LLC. sản xuất). Dung dịch phản ứng chứa 100 μL dung dịch nước 1% của mỗi cơ chất này, 50 μL

dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH bằng 5,5), 40 μ L nước tinh khiết, và 10 μ L dung dịch mẫu enzym tinh khiết. Dung dịch này được để phản ứng trong 20 phút ở nhiệt độ 70°C. Tương tự như phương pháp được mô tả ở phần 8, lượng đường khử được tạo ra bởi quá trình thủy phân của enzym được xác định, và hoạt tính riêng (U/mg) được xác định. Mỗi phép định lượng được thực hiện độc lập ba lần, và trị số trung bình và độ lệch chuẩn được xác định.

Fig.4 thể hiện kết quả xác định độ đặc hiệu cơ chất của biến thể AR19G-166RASFS. AR19G-166RASFS có hoạt tính thủy phân mạnh cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric hòa tan trong nước (PSA) (1,90589 U/mg), và có hoạt tính phân giải Lichenan chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 (0,12553 U/mg). Ngược lại, AR19G-166RASFS gần như không có hoạt tính phân giải CMC (0,01026 U/mg) hoặc Laminarin chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,6 (-0,16264 U/mg). Mặc dù AR19G-166RASFS có hoạt tính thủy phân rất yếu đối với Avicel xenluloza tinh thể (0,08606 U/mg), nhưng AR19G-166RASFS được ghi nhận là có hoạt tính thủy phân Avicel xenluloza tinh thể trong thử nghiệm này, trong đó phản ứng được thực hiện trong 2 giờ (0,18001 U/mg). AR19G-166RASFS không có hoạt tính thủy phân xylan (-0,015 U/mg).

Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ

Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ đối với hoạt tính thủy phân PSA của AR19G-166RASFS được đánh giá. Để đo hoạt tính thủy phân PSA, dung dịch phản ứng chứa 100 μ L dung dịch PSA 1%, 50 μ L dung dịch đệm axetat (độ pH bằng 5,5), 40 μ L nước tinh khiết, và 10 μ L dung dịch mẫu enzym tinh khiết được sử dụng, và dung dịch này được để phản ứng trong 20 phút ở nhiệt độ bằng 50°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, hoặc 99°C. Lượng đường khử được tạo ra bởi quá trình thủy phân của enzym được xác định. Ngoài ra, hoạt tính enzym được tính bằng 1 μ mol đường khử được tạo ra trong 1 phút được xác định là 1U, và trị số thu được bằng cách lấy hoạt tính enzym chia cho lượng protein được xác định là hoạt tính riêng (U/mg). Ngoài ra, 0,5mM ion canxi hoặc 0,5mM ion mangan được bổ sung vào dung dịch phản ứng, và hoạt tính thủy phân PSA được đo bằng phương pháp giống như phương pháp nêu trên.

Fig.5 thể hiện kết quả đánh giá mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ đối với hoạt tính

thủy phân PSA của AR19G-166RASFS. Đối với hoạt tính thủy phân PSA của AR19G-166RASFS, $T_{\text{tối ưu}} = 90^{\circ}\text{C}$ ở độ pH bằng 5,5. Ngoài ra, trong mọi trường hợp khi 0,5mM ion canxi hoặc 0,5mM ion mangan được bổ sung vào dung dịch phản ứng enzym - cơ chất, $T_{\text{tối ưu}}$ tăng đến 95°C . Ở toàn bộ các khoảng nhiệt độ, đã kiểm chứng thấy rằng việc bổ sung ion canxi hoặc ion mangan đã cải thiện hoạt tính thủy phân PSA. Đặc biệt, hoạt tính thủy phân PSA ở nhiệt độ tối ưu đã tăng gần gấp đôi khi bổ sung ion mangan, và khi bổ sung cation kim loại hóa trị hai đã làm ổn định protein enzym.

Mức độ phụ thuộc vào độ pH

Mức độ phụ thuộc vào độ pH đối với hoạt tính thủy phân PSA của AR19G-166RASFS được đánh giá. Để đo hoạt tính thủy phân PSA, dung dịch PSA 0,5% khối lượng được sử dụng làm cơ chất; độ pH của dung dịch phản ứng tương ứng được điều chỉnh bằng dung dịch đệm Mcllvain (độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 8); và phản ứng thủy phân được thực hiện ở nhiệt độ 50°C , 70°C , hoặc 90°C ở mỗi độ pH được đánh giá. Fig.6 thể hiện kết quả đánh giá mức độ phụ thuộc vào độ pH đối với hoạt tính thủy phân PSA của AR19G-166RASFS. Hoạt tính thủy phân PSA ở nhiệt độ 50°C , 70°C , và 90°C tương ứng với độ pH thực tế đo được của dung dịch phản ứng được đo và vẽ đồ thị.

Như được thể hiện trên Fig.6, độ pH tối ưu của phản ứng thủy phân PSA của biến thể tinh khiết AR19G-166RASFS thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ phản ứng, và ở nhiệt độ 90°C , biến thể AR19G-166RASFS có hoạt tính thủy phân PSA mạnh nhất ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5. Ở nhiệt độ 50°C và 70°C , độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 4 đến 6. Trong mọi trường hợp, các biến thể có hoạt tính thủy phân PSA yếu ở độ pH bằng 7,0 hoặc cao hơn.

Đánh giá độ ổn định nhiệt bằng cách đo hoạt tính thủy phân PSA

Các trị số dùng để đánh giá độ ổn định nhiệt của protein, bao gồm nhiệt độ biến tính hoặc nhiệt độ nóng chảy (T_m). Nhiệt độ ủ sơ bộ, ở đó hoạt tính enzym giảm và bằng 50% hoạt tính enzym của mẫu chưa xử lý do quá trình gia nhiệt sơ bộ (ủ sơ bộ) được thực hiện trong khoảng thời gian nhất định, là gần bằng nhiệt độ nóng chảy T_m của protein, và có thể được xác định bằng cách đo hoạt tính enzym. Theo phương pháp này, nhiệt độ nóng chảy T_m của biến thể AR19G-166RA và biến thể AR19G-166RASFS được xác định.

Cụ thể, độ ổn định nhiệt của biến thể AR19G-166RASFS được đánh giá bằng cách gia nhiệt sơ bộ trong 40 phút trong điều kiện không có cơ chất và sử dụng trị số đánh giá là nhiệt độ T_{50} , ở đó hoạt tính thủy phân PSA giảm 50%. Dữ liệu tương ứng được tính gần đúng bằng cách sử dụng hàm logistic, và nhiệt độ ở đó hoạt tính tương đối bằng 50% trên đồ thị gần đúng được xác định là T_{50} .

Fig.7 thể hiện kết quả đánh giá độ ổn định nhiệt. Ở biến thể AR19G-166RA, $T_{50} = 75,6^{\circ}\text{C}$. Ngược lại, ở biến thể AR19G-166RASFS, trong đó ba gốc axit amin được thay thế, $T_{50} = 91,2^{\circ}\text{C}$ (ở thời điểm khi hoạt tính thủy phân PSA được định lượng ở nhiệt độ 50°C) hoặc $T_{50} = 92,0^{\circ}\text{C}$ (ở thời điểm khi hoạt tính thủy phân PSA được định lượng ở nhiệt độ 70°C). Biến thể AR19G-166RASFS có độ ổn định nhiệt bằng 15°C hoặc cao hơn so với AR19G-166RA.

Đánh giá độ ổn định nhiệt bằng phương pháp DSF

Phương pháp phân tích nhiệt cắt lớp (DSF) là phương pháp đo nhiệt độ biến tính của protein bằng thuốc nhuộm huỳnh quang và máy PCR định lượng, và có thể áp dụng cho nhiều protein. Thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng để phân tích nhiệt cắt lớp, như thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO, phát huỳnh quang trong điều kiện không phân cực, trong đó thuốc nhuộm gắn kết vào vị trí kỵ nước, bị ức chế do sự phát huỳnh quang trong điều kiện phân cực, trong đó thuốc nhuộm đã được hòa tan trong nước. Nhìn chung, cấu trúc uốn nếp của protein được tháo xoắn ở nhiệt độ biến tính của nó, và các vị trí kỵ nước trên cấu trúc này được bộc lộ ra khỏi bề mặt protein. Khi thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO gắn kết với các vị trí kỵ nước đã được bộc lộ, do ánh sáng kích thích có bước sóng nằm trong khoảng từ 470nm đến 480nm, thuốc nhuộm này tạo ra ánh sáng huỳnh quang có cực đại ở bước sóng bằng 595nm. Khi nhiệt độ của dung dịch protein được nâng dần trong khoảng thời gian nhất định, và mật độ huỳnh quang được đo, thì nhiệt độ nóng chảy (= nhiệt độ thay đổi mật độ huỳnh quang) được xác định.

Cụ thể, 2 μL thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO (do Life Technologies sản xuất) được pha loãng 100 lần, 1 μL các enzym protein ở nồng độ bằng 1mg/mL, 5 μL dung dịch đệm acetat 200mM (độ pH bằng 5,5), và 12 μL nước tinh khiết được bổ sung vào các giếng của đĩa PCR 96 giếng (đĩa PCR 96 giếng MLL-9651, do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất), và thể tích của mỗi giếng được điều chỉnh bằng 20 μL . Đĩa

PCR được đậy kín bằng các nắp đậy có 8 mũ chụp (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất), và sử dụng máy PCR định lượng (Hệ thống PCR định lượng CFX96 Touch, do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất), nhiệt độ của các giếng được tăng từ 30°C đến 100°C mỗi lần 0,5°C. Sau 30 giây kể từ khi nhiệt độ đạt đến nhiệt độ mục đích, mật độ huỳnh quang của các giếng tương ứng được định lượng đồng thời. Thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO được kích thích bằng đi-ốt phát quang (LED) có bước sóng ánh sáng phát ra nằm trong khoảng từ 450nm đến 490nm, và ánh sáng được phát xạ từ thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO được cho đi qua bộ lọc thông dải ở bước sóng nằm trong khoảng từ 560nm đến 580nm. Mật độ huỳnh quang được định lượng bằng máy ảnh CCD, và sự thay đổi về mật độ huỳnh quang được vẽ đồ thị dưới dạng hàm số của nhiệt độ. Nhiệt độ biến tính (nhiệt độ nóng chảy; trị số T_m) được xác định là trị số cực đại của hàm số “ $-d(\text{mật độ huỳnh quang})/dT$ ” được thể hiện bằng đồ thị đạo hàm bậc nhất (phần đồ thị bên dưới của Fig.8) của đồ thị mật độ huỳnh quang dưới dạng hàm số của nhiệt độ. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm CFX Manager (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) được tích hợp trên máy PCR định lượng. Ngoài ra, 3mM ion canxi được bổ sung vào các dung dịch phản ứng tương ứng, và các dung dịch thu được được định lượng bằng phương pháp giống như phương pháp này.

Fig.8 thể hiện sự thay đổi về mật độ huỳnh quang của thuốc nhuộm huỳnh quang màu cam SYPRO được định lượng bằng phương pháp DSF và gây ra bởi sự biến tính nhiệt của mỗi protein enzym của biến thể AR19G-166RA và AR19G-166RASFS. Phần đồ thị bên trên Fig.8 là dữ liệu thực đo được, và phần đồ thị bên dưới của Fig.8 thể hiện đạo hàm bậc nhất “ $-d(\text{mật độ huỳnh quang})/dT$ ” của đồ thị thay đổi mật độ huỳnh quang của phần đồ thị bên trên Fig.8. Ngoài ra, nhiệt độ nóng chảy của mỗi protein enzym được định lượng độc lập 3 lần bằng phương pháp DSF. Các trị số trung bình được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Enzym	Nhiệt độ nóng chảy đo được bằng phương pháp DSF (°C, trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn)
AR19G-166RA	80,5 $\pm$ 0,0 (n = 3)
AR19G-166RA và 3mM Ca^{2+}	85,7 $\pm$ 0,2 (n = 3)
AR19G-166RASFS	93,0 $\pm$ 0,0 (n = 3)

AR19G-166RASFS và 3mM Ca ²⁺	96,0 ± 0,0 (n = 3)
---	--------------------

Trên đồ thị mật độ huỳnh quang DSF của các protein enzym mã hóa bởi biến thể AR19G-166RASFS, các cực đại quan sát thấy được ở nhiệt độ khoảng 95°C, và nhiệt độ biến tính $T_m = 93,0 \pm 0,0$ (n = 3) (Bảng 3). Trị số nhiệt độ biến tính là gần bằng nhiệt độ tối ưu $T_{\text{tối ưu}} > 90^\circ\text{C}$ của enzym được xác định từ hoạt tính thủy phân PSA hoặc hoạt tính enzym có nhiệt độ $T_{50} = 91,2^\circ\text{C}$ và $92,0^\circ\text{C}$.

Ngược lại, trên đồ thị mật độ huỳnh quang DSF của biến thể AR19G-166RA, các cực đại quan sát thấy được ở nhiệt độ khoảng 83°C, và trị số T_m bằng $80,5 \pm 0,0^\circ\text{C}$ (n = 3). Kết quả này cho thấy độ ổn định nhiệt của biến thể AR19G-166RASFS đã tăng 12,5°C so với độ ổn định nhiệt của biến thể AR19G-166RA.

Đã biết các ion kim loại hóa trị hai có tác dụng ổn định cấu trúc của protein bằng cách gắn kết với protein, do đó cải thiện độ ổn định nhiệt của protein. Ở biến thể AR19G-166RA, do bổ sung 3mM Ca²⁺, nên nhiệt độ biến tính T_m được xác định bằng phương pháp DSF đã tăng 5,2°C và bằng $85,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (n=3). Ở biến thể AR19G-166RASFS, do bổ sung 3mM Ca²⁺, nên T_m đã tăng 5,2°C và bằng $96,0 \pm 0,0^\circ\text{C}$ (n=3). Đã biết nhiệt độ biến tính cao nhất của xenlobiohydrolaza là bằng $96,0^\circ\text{C}$.

Xenluloza tinh thể khó phân giải được thủy phân thành glucoza là thành phần polysaccharit chủ yếu của ba enzym thuộc họ glycosit hydrolaza. Endoglucanaza (xenlulaza hoặc endo-1,4-β-D-glucanaza, EC 3.2.1.4) phân cắt ngẫu nhiên liên kết 1,4-β glycosit của chuỗi glucan, và tạo ra các oligosaccharit có chiều dài khác nhau. Xenlobiohydrolaza là exo-glucanaza (1,4-β-xenlobiosidaza hoặc xenlobiohydrolaza, EC 3.2.1.91) phân cắt liên tục chuỗi glucan từ đầu tận cùng dạng khử (CBH thuộc họ GH7, ví dụ, TrCel7A hoặc CBH I) hoặc đầu tận cùng dạng không khử của nó (CBH thuộc họ GH6; TrCel6A hoặc CBH II), và tạo ra xenlobioza. β-glucosidaza (β-1,4-glucosidaza, EC 3.2.1.21) thủy phân xenlobioza và tạo ra glucoza.

Các kết quả nêu trên cho thấy biến thể AR19G-166RASFS được tạo ra bằng cách thay thế ba gốc axit amin ở biến thể AR19G-166RA là biến thể có nhiệt độ tối ưu lẫn nhiệt độ biến tính đều được cải thiện. Các kết quả này cũng cho thấy hoạt tính enzym có nhiệt độ T_{50} , ở đó hoạt tính thủy phân PSA giảm 50%, và nhiệt độ biến tính T_m được xác

định bằng phương pháp DSF của biến thể này lần lượt bằng 10,5°C và 12,5°C. Cụ thể, T_{50} và T_m của biến thể AR19G-166RASFS đều cao và độ ổn định nhiệt của biến thể protein này được cải thiện.

Nhiều enzym xenulaza siêu chịu nhiệt có hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ bằng 80°C hoặc cao hơn đã được phân lập từ quần thể vi sinh vật sống trong môi trường khắc nghiệt như miệng thủy nhiệt. Tuy nhiên, chưa có xenlobiohydrolaza có hiệu suất thủy phân cao nhất, enzym có đủ độ ổn định nhiệt. Theo đó, chưa có dung dịch enzym siêu chịu nhiệt phân giải và thủy phân sinh khối lignoxenluloza ở nhiệt độ bằng 80°C hoặc cao hơn. Khi xenlobiohydrolaza AR19G-166RASFS có độ ổn định nhiệt rất cao được sử dụng, có thể thu được dung dịch enzym có khả năng thủy phân lignoxenluloza ở nhiệt độ cao.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HONDA MOTOR CO., LTD.
 <120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT XENLOBIOHYDROLAZA SIÊU CHỊU NHIỆT, THỂ BIẾN NẠP VÀ VECTO BIỂU HIỆN
 <130> H113339501
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> AR19G-166RASFS
 <400> 1

```

Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp
1      5      10      15
Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu
      20      25      30
Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu
      35      40      45
Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu
      50      55      60
Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile
      65      70      75      80
Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala
      85      90      95
Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys
      100     105     110
Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr
      115     120     125
Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser Leu Pro Asn
      130     135     140
Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala
      145     150     155     160
Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro
      165     170     175
Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp
      180     185     190
Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln
      195     200     205
Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val
      210     215     220
Ala Asn Tyr Thr Pro Phe Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu
      225     230     235     240
Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn
      245     250     255
Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe
      260     265     270
Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser
      275     280     285
Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Arg Cys Arg Pro Thr Gly
      290     295     300
Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg
      305     310     315     320
Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly
      325     330     335
Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Ala Tyr
      340     345     350
Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly
      355     360     365
Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp
      370     375     380
Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu
      385     390     395     400
Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Ser Glu Ile
      405     410     415
Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
      420     425

```

<210> 2
 <211> 1284
 <212> ADN
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> AR19G-166RASFS
 <400> 2

```

ttggacaatc cattcatcgg agccatcgga tacgtgaatc cggactgggc aaccaatgtg      60
atcagccaag cgaaccaaac ggctgatcca accttggcgg ctcaaatgcg taaggtggcc      120
acctactcca cagctgtctg gttggatcgt atcgccgccca tcaccgctgg ccgcggattg      180

```

```

cgcgggcatt tggatgaagc gctacgccaa atgcagcaag ctggccagcc ggttgtgac 240
acccttgtga tctatgatct gtcaaatcga gattgctctg ctgctgcctc caatggcgaa 300
ttactggtcg cccagaatgg actggcccg c tacaaagcgg agttcatcga tcccatcgta 360
gccattctct cagatccccg atatgccggg ctacgcacg tcaccatcat cgaaccggac 420
tccttaccga acctggtcac gaacctcagc atcccgccat gcgcagaagc tcagaatgca 480
tatatcgaag ggatccgcta tgcggtgaac cggctgcgga caattcccaa cgtctacatc 540
tatctggata tcgcccaactc aggtctggtg ggctgggata ataactttaa tggggcagta 600
aatctctaca cccaagttgt gcaaggaatg gatcaagggt ttaacagtat cgatggattc 660
atcaccaacg ttgccaaacta taccoccttc gaagaaccct atttgcccga tcccaacctg 720
accatcgctg ggcaaccogt tcgctctgcc agcttctacg aatggaaccc ctactttgat 780
gagctggatt acgctctggc tctgcgcaac gcttttatcg gacgaggctt ccccgacc 840
attgggatgc tcactgatac cagccgaaac ggggtggggcg gatgcagcta tggggcagtc 900
aggcccaagg gtcccagttc agataccagc agcgtgaatg cctacgtgga cggctcgcga 960
gtagaccgac gctatcatcg gggcaactgg tgtaaccagg cgggtgggat cggcgagcgc 1020
cctcaggccg caccgcggtc cgggtatcgac gcctacgtgt gggtgaaacc acctggggag 1080
tccgatgggg tcagccaacc cgggatcgtc gatcccgacg atcccaacaa gaagttcgat 1140
cctatgtgtg atcccaacg acagagccgg tataactccg catacccaac tggggctctg 1200
cccaacgcgc cccacgctgg gcggtggttc ccgcagcagt ccgaaatcct ggtgcggaac 1260
gcctatccgc cgatccaacc ctaa

```

1284

<210> 3

<211> 427

<212> PRT

<213> Trình tự chưa biết

<220>

<223> AR19G-166QA

<400> 3

```

Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp
1 5 10 15
Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu
20 25 30
Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu
35 40 45
Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu
50 55 60
Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile
65 70 75 80
Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala
85 90 95
Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys
100 105 110
Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr
115 120 125
Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser Leu Pro Asn
130 135 140
Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala
145 150 155 160
Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro
165 170 175
Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp
180 185 190
Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln
195 200 205
Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val
210 215 220
Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu
225 230 235 240
Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn
245 250 255
Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe
260 265 270
Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser
275 280 285
Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Gln Cys Arg Pro Thr Gly
290 295 300
Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg
305 310 315 320
Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly
325 330 335
Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Ala Tyr
340 345 350
Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly
355 360 365
Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp
370 375 380
Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu
385 390 395 400
Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Phe Glu Ile
405 410 415
Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro

```

420 425

<210> 4
 <211> 1284
 <212> ADN
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> AR19G-166QA
 <400> 4

ttggacaatc cattcatcgg agccatcgga tacgtgaatc cggactgggc aaccaatgtg 60
 atcagccaag cgaaccaaac ggctgatcca acctggcggt ctcaaagtcg taaggtggcc 120
 acctactcca cagctgtctg gttggatcgt atcgccgcca tcaccgctgg ccgcggtattg 180
 cgcgggcatt tggatgaagc actacgcca atgcagcaag ctggccagcc ggttgtgac 240
 acccttgtga tctatgatct gccaaatcga gattgctctg ctgctgcctc caatggcgaa 300
 ttactggctg cccagaatgg actggcccgc tacaaagcgg agttcatcga tcccatcgta 360
 gccattctct cagatccccg atatgccggg ctacgcacgt tcaccatcat cgaaccggac 420
 tccttaccca acctgggtcac gaacctcagc atcccggcat gcgcagaagc tcagaatgca 480
 tatatcgaag ggatccgcta tgcggtgaac cggtgcgga caattcccaa cgtctacatc 540
 tatctggata tcgcccactc aggtctggtg ggctgggata ataactttaa tggggcagta 600
 aatctctaca cccaagttgt gcaaggaatg gatcaagggt ttaacagtat cgatggattc 660
 atcaccaacg ttgccaacta tacccccctc gaagaaccct atttgcccga tcccaacctg 720
 acccttgcgt ggcaaccgt tgcctctgac agcttctacg aatggaacc ctaacttgat 780
 gagctggatt acgctctggc tctgcgcaac gcttttatcg gacgaggctt cccagcacc 840
 attgggatgc tcatcgatac cagccgaaac gggtggggcg gatgcagcta tgggcaatgc 900
 aggccacagg gtcccagttc agataaccagc agcgtgaatg cctacgtgga cggtcgcga 960
 gtagaccgac ggtatcatcg ggcaactggt tgtaaccagg cgggtgggat cggcgagcgc 1020
 cctcaggccg caccgcggtc cgggtatcgac gcctacgtgt gggtgaaacc acctggggag 1080
 tccgatgggg tcagccaacc cgggatcgtc gatcccagc atcccaacaa gaagttcgat 1140
 cctatgtgtg atcccaacgg acagagccgg tataactccg cataccaac tggggctctg 1200
 cccaacgcgc cccacgctgg gcggtggtc ccgcagcagt tcgaaatcct ggtgcggaac 1260
 gcctatccgc cgatccaacc ctaa 1284

<210> 5
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> Trình tự axit amin mã hóa bởi khung đọc mã mở AR19G-166
 <400> 5

Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Ala Ala Pro Thr Ala Thr Pro Thr Pro
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Thr Ala Thr Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Thr Leu Thr
 20 25 30
 Ser Thr Pro Gly Pro Thr Pro Thr Pro Pro Pro Ser Gly Thr His Leu
 35 40 45
 Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp Ala
 50 55 60
 Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu Asp
 85 90 95
 Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu Asp
 100 105 110
 Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile Thr
 115 120 125
 Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala Ser
 130 135 140
 Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys Ala
 145 150 155 160
 Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr Ala
 165 170 175
 Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser Leu Pro Asn Leu
 180 185 190
 Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala Tyr
 195 200 205
 Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro Asn
 210 215 220
 Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp Asp
 225 230 235 240
 Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln Gly
 245 250 255
 Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val Ala
 260 265 270
 Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu Thr
 275 280 285
 Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn Pro
 290 295 300
 Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe Ile
 305 310 315 320
 Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser Arg
 325 330 335

Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Gln Cys Arg Pro Thr Gly Pro
 340 345 350
 Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg Val
 355 360 365
 Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly Ile
 370 375 380
 Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Ala Tyr Val
 385 390 395 400
 Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly Ile
 405 410 415
 Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp Pro
 420 425 430
 Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu Pro
 435 440 445
 Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Phe Glu Ile Leu
 450 455 460
 Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
 465 470

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đầu 3' của mỗi xuôi

<400> 6

ttggacaatc cattcatcgg ag

22

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi xuôi

<400> 7

caccatgttg gacaatccat tcacggag

29

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi ngược

<400> 8

ttaggggttg atcggcggat ag

22

<210> 9

<211> 427

<212> PRT

<213> Trình tự chưa biết

<220>

<223> AR19G-166QV

<400> 9

Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp

1 5 10 15

Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu

20 25 30

Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu

35 40 45

Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu

50 55 60

Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile

65 70 75 80

Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala

85 90 95

Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys

100 105 110

Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala

145 150 155 160

Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro

165 170 175

Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp

180 185 190

Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln

195 200 205

Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val

210 215 220

Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu

225 230 235 240

Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn
 245 250 255
 Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe
 260 265 270
 Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser
 275 280 285
 Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Gln Cys Arg Pro Thr Gly
 290 295 300
 Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly
 325 330 335
 Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Val Tyr
 340 345 350
 Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly
 355 360 365
 Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp
 370 375 380
 Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu
 385 390 395 400
 Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Phe Glu Ile
 405 410 415
 Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
 420 425

<210> 10
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> ARL9G-166RA
 <400> 10

Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp
 1 5 10 15
 Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu
 20 25 30
 Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu
 35 40 45
 Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu
 50 55 60
 Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys
 100 105 110
 Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr
 115 120 125
 Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser Leu Pro Asn
 130 135 140
 Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala
 145 150 155 160
 Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro
 165 170 175
 Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp
 180 185 190
 Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln
 195 200 205
 Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val
 210 215 220
 Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu
 225 230 235 240
 Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn
 245 250 255
 Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe
 260 265 270
 Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser
 275 280 285
 Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Arg Cys Arg Pro Thr Gly
 290 295 300
 Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly
 325 330 335
 Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Ala Tyr
 340 345 350
 Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly
 355 360 365
 Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp
 370 375 380

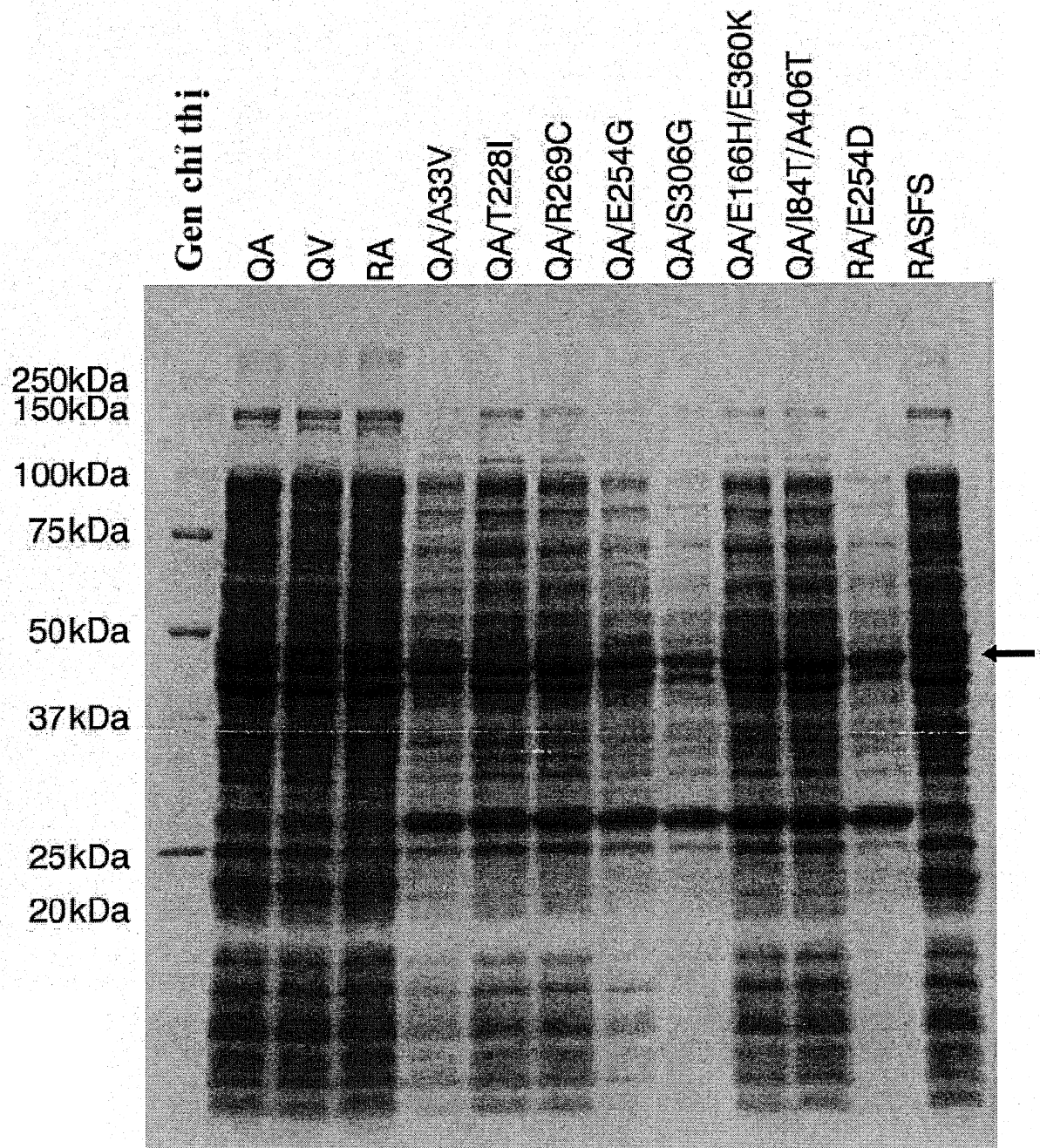
Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu
 385 390 395 400
 Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Phe Glu Ile
 405 410 415
 Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
 420 425
 <210> 11
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Herpetosiphon aurantiacus DSM 785
 <220>
 <223> Miền xúc tác của họ glycosit hydrolaza 6
 <400> 11
 Val Ala Asn Pro Phe Val Gly Ala Gln Gly Tyr Ile Asn Ser Glu Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Val Asn Ala Glu Ala Asn Ala Thr Gly Gly Thr Leu Gly
 20 25 30
 Ser Gln Met Arg Gln Val Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Val Trp Leu Asp
 35 40 45
 Arg Ile Ala Ala Ile Ala Gly Ser Ser Glu Ser Met Gly Leu Arg Ala
 50 55 60
 His Leu Asp Ala Ala Leu Val Gln Gln Gln Thr Ser Gly Gln Gln Val
 65 70 75 80
 Ala Ile Ser Ile Val Val Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ala Ala
 85 90 95
 Leu Ala Ser Asn Gly Glu Leu Lys Ile Ser Glu Asn Gly Leu Asn Arg
 100 105 110
 Tyr Lys Thr Glu Tyr Ile Asp Pro Ile Ala Ala Ile Val Gly Glu Ser
 115 120 125
 Lys Tyr Ala Ser Leu Arg Ile Val Val Ile Leu Glu Pro Asp Ser Leu
 130 135 140
 Ser Asn Leu Val Thr Asn Ala Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Ile
 145 150 155 160
 Ser Ser Gly Ala Tyr Val Gln Gly Val Gln Tyr Ala Ile Asn Lys Leu
 165 170 175
 Asn Val Thr Ser Asn Val Tyr Ile Tyr Met Asp Ile Ala His Ser Gly
 180 185 190
 Trp Leu Gly Trp Asp Ser Asn Phe Thr Pro Ala Ile Gln Leu Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Thr Val Arg Gly Thr Thr Lys Gly Leu Asn Gly Ile Asp Gly Phe
 210 215 220
 Ile Ser Asn Thr Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Asn Glu Val Phe Leu Pro
 225 230 235 240
 Asn Ser Gly Leu Thr Leu Gly Gly Gly Asn Pro Ile Arg Ser Ser Leu
 245 250 255
 Phe Tyr Glu Trp Asn Pro Tyr Phe Asp Glu Thr Asp Tyr Val Leu Ala
 260 265 270
 Met Arg Asn Ala Phe Ile Thr Ala Gly Phe Pro Ser Gly Ile Gly Met
 275 280 285
 Leu Ile Asp Thr Ser Arg Asn Gly Trp Gly Gly Thr Ala Arg Pro Thr
 290 295 300
 Met Val Ser Ser Ser Asn Ser Leu Glu Ile Tyr Val Asn Asp Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Asp Arg Arg Pro His Arg Gly Gly Trp Cys Asn Gln Ala Gly Ala
 325 330 335
 Gly Ile Gly Glu Arg Pro Thr Ala Ala Pro Val Ser Gly Ile Asp Ala
 340 345 350
 Tyr Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ala Thr Ala
 355 360 365
 Gly Val Ile Asp Pro Thr Asp Pro Ala Lys Gln Phe Asp Ala Met Cys
 370 375 380
 Asp Pro Asn Ala Gln Asn Arg Tyr Asn Thr Ala Tyr Pro Thr Asn Ala
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Ser Gln Phe Ala
 405 410 415
 Met Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Ser Gln
 420 425

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt bao gồm bước nuôi cấy thể biến nạp biểu hiện axit nucleic mã hóa vùng xenlobiohydrolaza chứa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, và có serin ở vị trí số 88, phenylalanin ở vị trí số 230, và serin ở vị trí số 414 của trình tự axit amin này, trong đó xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt này có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0.
2. Thể biến nạp chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, và có serin ở vị trí số 88, phenylalanin ở vị trí số 230, và serin ở vị trí số 414 của trình tự axit amin này, và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0.
3. Vector biểu hiện chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1, và có serin ở vị trí số 88, phenylalanin ở vị trí số 230, và serin ở vị trí số 414 của trình tự axit amin này, và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0.

Fig.1

AR19G-166QA	1	LDNPFIGAIGYVNPDMATNVISQANQTADPTLAAQMRKVATYSTAVMLDRIAATAGRGLRGHLDEALRQMQQAGQPWVI	80
AR19G-166QV	1		80
AR19G-166RA	1		80
AR19G-166RASFS	1		80
AR19G-166QA	81	TLVIYDLPNRDCSAAASNGELLVAQNGLARAKAEFTDPIVAILSDPRYAGLRIVITIEPDSLPNLVTNLSIPACAEQNA	160
AR19G-166QV	81		160
AR19G-166RA	81		160
AR19G-166RASFS	81	S	160
AR19G-166QA	161	YIEGIRYAVNRLRTIPNVVYTYLDIAHSGNLGWDNNFNGAVNLYTQVQGMQGFNSIDGFIITNVANVTPLEPYLPDPNL	240
AR19G-166QV	161		240
AR19G-166RA	161		240
AR19G-166RASFS	161	 E	240
AR19G-166QA	241	TIAGQPVRSASFYEMNPYFDELDYALALRNAFIGRGFPSTIGMLIDTSRNGWGGCSYGQCRPTGSPSDTSSVNAVVDGSR	320
AR19G-166QV	241		320
AR19G-166RA	241	 R	320
AR19G-166RASFS	241	 R	320
AR19G-166QA	321	VDRRYHRGNWCNQAGGIGERPQAAPRSGIDAYVWVKPPGESDGVSQPGIVDPPDPNKKFDPMCDPNGQSRYSAYPTGAL	400
AR19G-166QV	321	 V	400
AR19G-166RA	321		400
AR19G-166RASFS	321		400
AR19G-166QA	401	PNAPHAGRWFPQQFEILVRNAYPPIQP	427
AR19G-166QV	401		427
AR19G-166RA	401		427
AR19G-166RASFS	401	 S	427

**Fig.2**

Hoạt tính thủy phân PSA của các biến thể AR19G-166

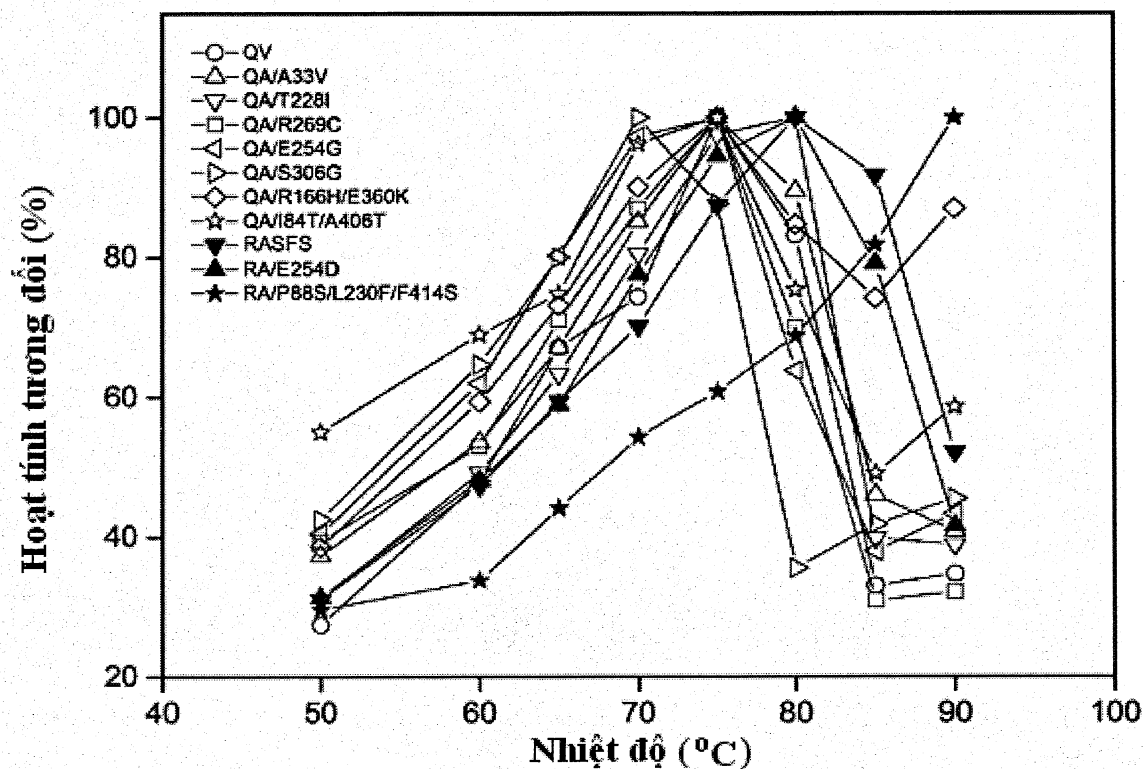


Fig.3

Độ đặc hiệu cơ chất của biến thể AR19G-166RASFS

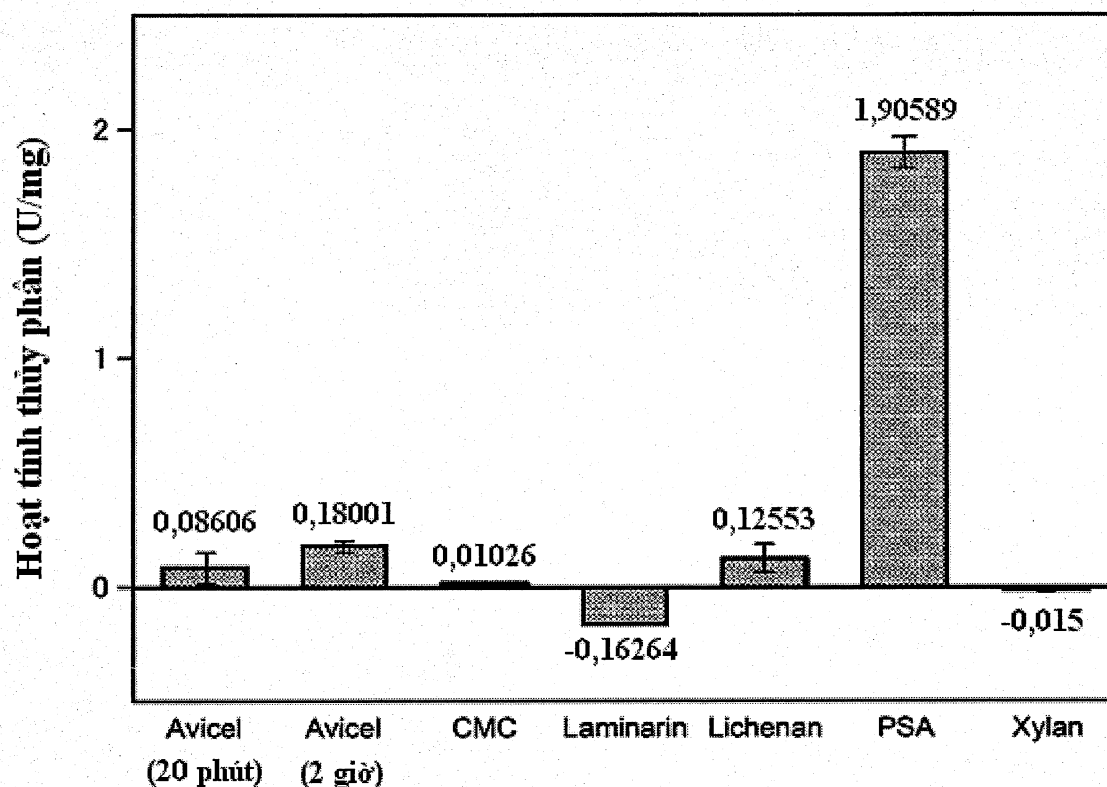
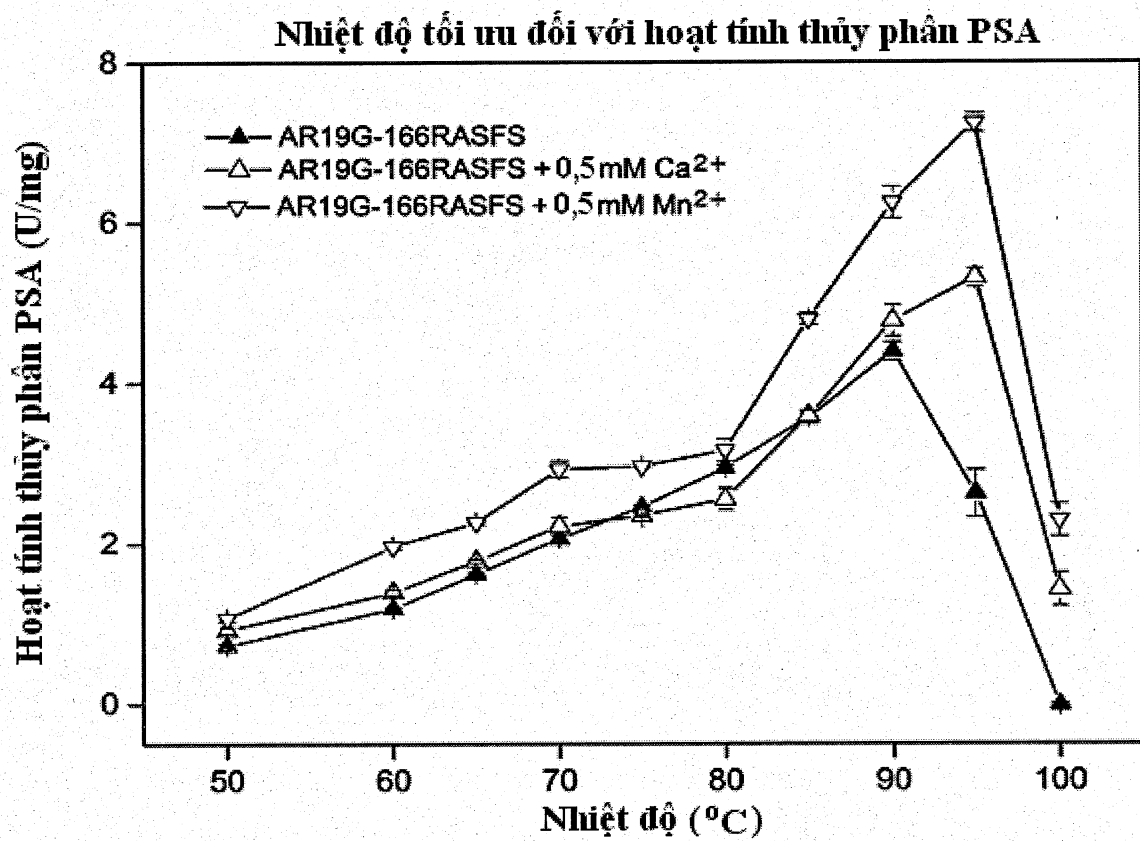
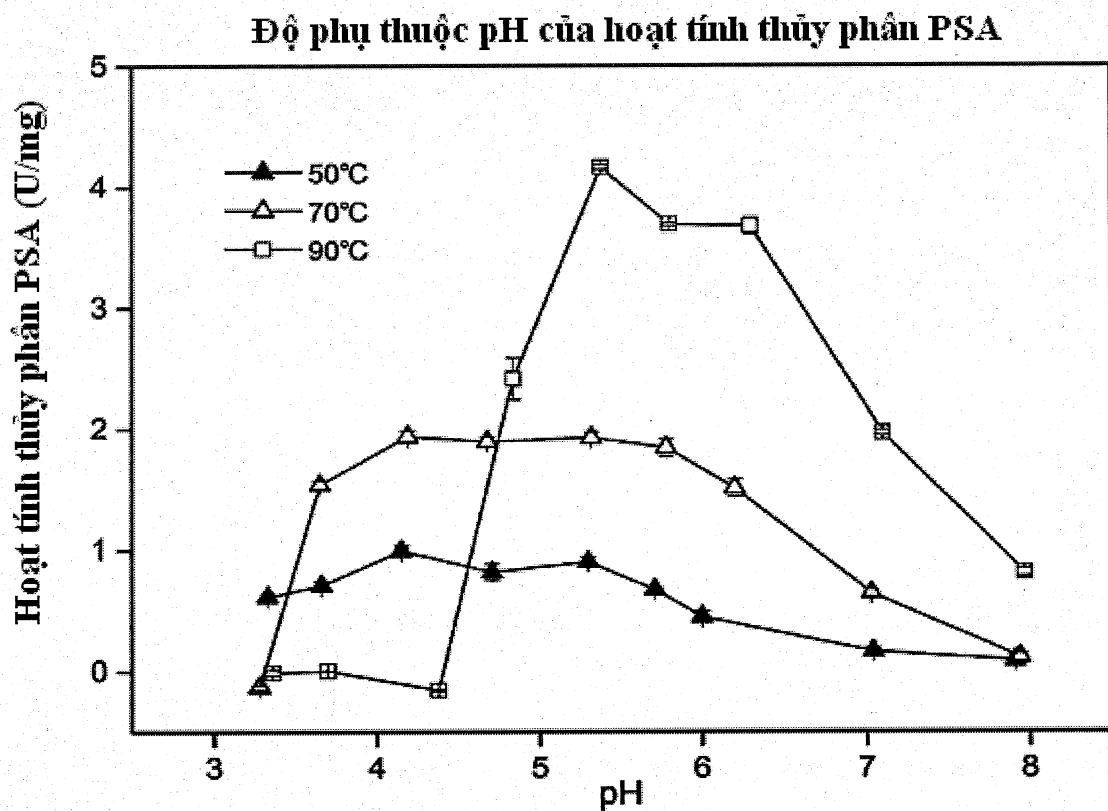


Fig.4

**Fig.5****Fig.6**

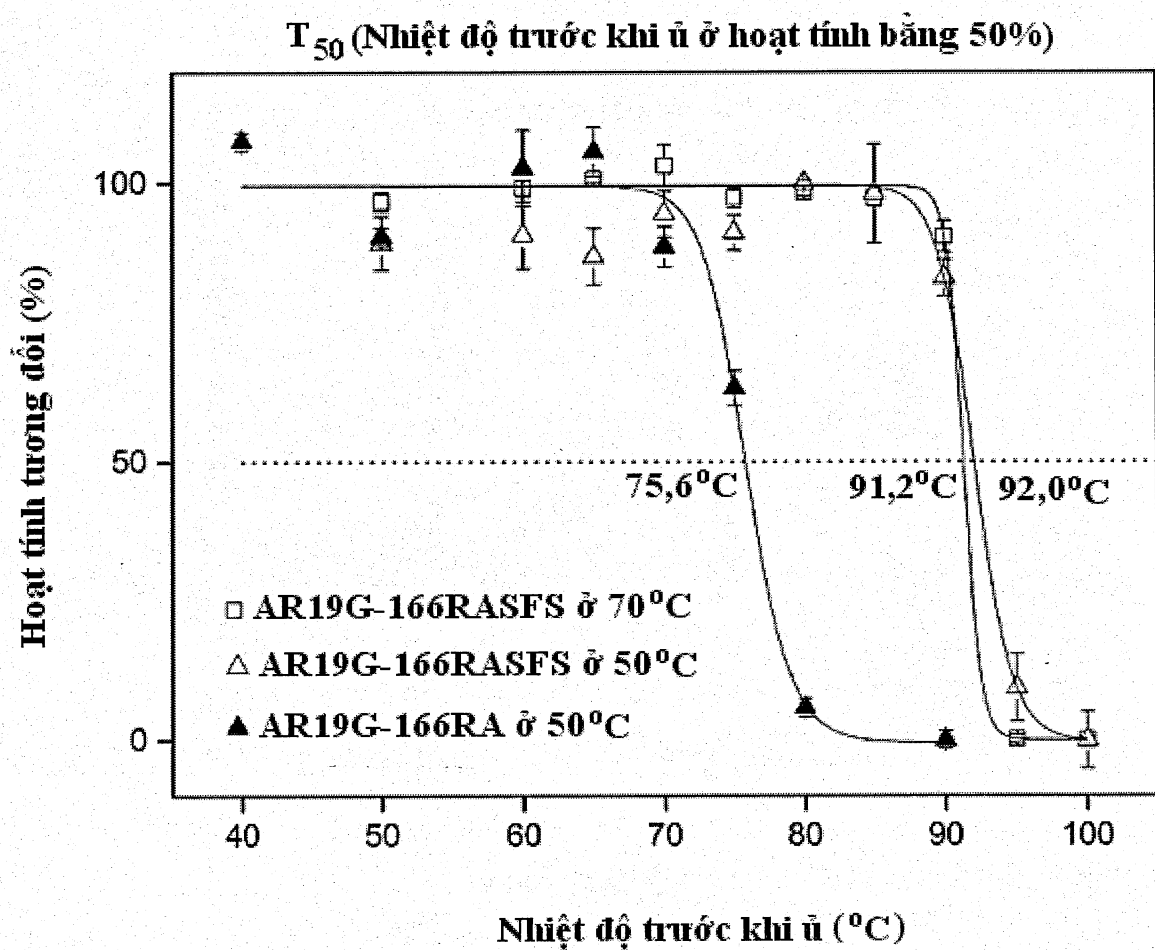
**Fig.7**

Fig.8

Phương pháp phân tích nhiệt cắt lớp

