



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

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

(11)



1-0030157

(51)⁷ C12N 1/19; C12P 7/06

(13) B

(21) 1-2015-01558

(22) 10/10/2013

(86) PCT/JP2013/077674 10/10/2013

(87) WO 2014/058034 A1 17/04/2014

(30) 2012-225391 10/10/2012 JP

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/08/2015 329A

(73) JX NIPPON OIL & ENERGY CORPORATION (JP)

6-3, Otemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8162 Japan

(72) KONISHI Jin (JP); FUKUDA Akira (JP); MUTAGUCHI Kozue (JP); UEMURA Takeshi (JP).

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

(54) NẤM MEN BIẾN ĐỔI GEN CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT ETANOL TỪ XYLOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ETANOL

(57) Sáng chế đề cập đến nấm men có khả năng sản xuất etanol từ xyloza. Nấm men được đề cập đến theo sáng chế là nấm men biến đổi gen được tạo ra bằng cách đưa vào ít nhất một gen được chọn từ gen glutamat dehydrogenaza 2 (GDH2) và gen sorbitol dehydrogenaza 1 (SOR1) vào nấm men có ba gen, là gen enzym aldo-keto 3 (GRE3), SOR1 và gen xyluloza kinaza (XKS1) mà được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nó; hoặc nấm men biến đổi gen có ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1 mà được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nó. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất etanol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến nấm men có khả năng sản xuất etanol từ xyloza và phương pháp sản xuất etanol sử dụng loại nấm men này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, việc sử dụng etanol sinh học làm nhiên liệu vận tải đã thu hút được sự chú ý nhờ việc giảm phát thải CO₂. Cụ thể, phương pháp sản xuất etanol sinh học từ sinh khối trên cơ sở xenluloza đã được nghiên cứu. Do lượng xyloza chiếm khoảng 1/3 tổng lượng đường thu được từ sinh khối trên cơ sở xenluloza, để sử dụng hiệu quả các nguồn sinh khối, cần phải tạo ra loại vi khuẩn mà sản xuất etanol từ xyloza một cách hữu hiệu.

Hiện nay, để sản xuất etanol, các nấm men thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* chủ yếu được sử dụng làm nấm men bia. *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng sản xuất etanol cao từ các hexoza như glucoza và manoza và có khả năng chống chịu cao đối với etanol. Tuy nhiên, *Saccharomyces cerevisiae* không thể sử dụng các pentoza như xyloza.

Scheffersomyces stipitis được biết đến là nấm men có khả năng đồng hoá xyloza. Nhóm các gen tương ứng với nhóm các gen để đồng hoá xyloza của *Scheffersomyces stipitis* tồn tại sẵn trong *Saccharomyces cerevisiae*, nhưng nhận thấy là nhiều gen trong các gen này trong *Saccharomyces cerevisiae* không được biểu hiện, hoặc thậm chí nếu các gen được biểu hiện, mức độ biểu hiện của chúng là rất thấp. Do đó, sự biến đổi *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách đưa vào các gen thu được từ nấm men đồng hoá xyloza đã được khuyến khích.

Tuy nhiên, do các gen này là các gen ngoại sinh đối với *Saccharomyces cerevisiae*, nấm men được tạo ra theo phương pháp nêu trên thuộc loại tái tổ hợp, và điều này là không mong muốn bởi vì các hạn chế khác nhau bao gồm việc cần phải có phương tiện để ngăn ngừa sự rò của các tế bào nấm men ra ngoài được đặt ra khi sử dụng chúng.

Đồng thời, việc tạo ra nấm men có khả năng đồng hoá xyloza bằng cách hoạt hoá các gen đồng hoá xyloza vốn có trong *Saccharomyces cerevisiae* đã

được nghiên cứu (WO2010/001906, Tài liệu sáng chế 1). Nấm men thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật này có ưu điểm là nó không phải là gen tái tổ hợp bởi vì các gen đồng hoá xyloza thu được từ chính nấm men được sử dụng.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu tạo ra nấm men có khả năng sản xuất etanol từ xyloza được cải thiện hơn nữa.

Các tài liệu thuộc tình trạng kỹ thuật đã biết

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2010/001906

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Mong muốn tạo ra nấm men có khả năng đồng hoá xyloza mà trong đó khả năng sản xuất etanol từ xyloza được cải thiện hơn nữa. Theo đó, mục đích của sáng chế là nhằm cải tạo nấm men bằng cách đưa vào các gen đồng hoá xyloza để tạo ra nấm men có khả năng sản xuất etanol từ xyloza mỹ mãn và nấm men mà có lượng sản phẩm phụ tạo ra giảm.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã bỏ nhiều công sức thực hiện các nghiên cứu để giải quyết các vấn đề nêu trên, và đã phát hiện ra rằng nấm men có khả năng sản xuất etanol cao thu được khi ba gen, là GRE3 (gen aldo-keto reductaza 3), SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza 1) và XKS1 (gen xyluloza kinaza 1) được đưa vào trên nhiễm sắc thể nấm men và ít nhất một gen trong số các gen GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza 2) và SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza 1) được biểu hiện quá mức, và trong trường hợp chủng biểu hiện quá mức GDH2, lượng sản phẩm phụ tạo ra như xylitol hoặc glyxerol được giảm xuống. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã bỏ nhiều công sức nghiên cứu để giải quyết các vấn đề nêu trên, và đã phát hiện ra nấm men có khả năng sản xuất etanol cao cũng thu được khi gen liên kết của GRE3 và SOR1 và gen liên kết của SOR1 và XKS1 được đưa vào trên nhiễm sắc thể nấm men. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng nấm men thu được theo cách này có khả năng sử dụng xyloza cao và có thể được sử dụng để sản xuất etanol từ xyloza, và nhờ đó đã hình thành nên sáng

chế này.

Cụ thể là, sáng chế này đề cập đến các đối tượng dưới đây:

- (1) Nấm men biến đổi gen có ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó, trong đó ba gen được xen vào trên nhiễm sắc thể dưới dạng gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xyloza reductaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza.
- (2) Nấm men theo điểm (1), trong đó các gen này là các gen nội sinh của nấm men.
- (3) Nấm men theo điểm (1) hoặc (2), trong đó gen mã hoá xyloza reductaza là gen được chọn từ nhóm bao gồm GRE3, YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 và YDR124w.
- (4) Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (3), trong đó gen mã hoá xylitol dehydrogenaza là gen được chọn từ nhóm bao gồm SOR1, SOR2 và YLR070c.
- (5) Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (4), trong đó gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza lần lượt là GRE3, SOR1 và XKS1.
- (6) Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (5), trong đó nấm men là nấm men thuộc loài *Saccharomyces*.
- (7) Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (6), trong đó nấm men là *Saccharomyces cerevisiae*.
- (8) Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (7), mà có khả năng sản xuất etanol từ xyloza.
- (9) Phương pháp sản xuất etanol, bao gồm việc nuôi cấy nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm (1) đến (8) trong môi trường chứa xyloza để thu etanol từ môi trường nuôi cấy tạo ra.

Hơn nữa, sáng chế này còn đề cập đến các đối tượng dưới đây:

[1] Nấm men biến đổi gen được tạo ra bằng cách đưa vào theo chức năng ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza vào vật chủ nấm men có ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó.

[2] Nấm men theo điểm [1], trong đó các gen này thu được từ vật chủ nấm men.

[3] Nấm men theo điểm [1] hoặc [2], trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được xen vào theo chức năng trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men.

[4] Nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [3], mà được tạo ra bằng cách đưa vào theo chức năng ít nhất một gen được chọn từ GDH2 và SOR1 vào vật chủ nấm men có ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1, được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó.

[5] Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [4], trong đó nấm men có ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào là nấm men thuộc loài *Saccharomyces*.

[6] Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [5], trong đó nấm men có ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào là *Saccharomyces cerevisiae*.

[7] Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [6], mà có khả năng sản xuất etanol từ xyloza.

[8] Phương pháp sản xuất etanol, bao gồm việc nuôi cấy nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [7] trong môi trường chứa xyloza để thu etanol từ môi trường nuôi cấy tạo ra.

[9] Phương pháp theo điểm [8], trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được đưa vào nấm men biến đổi gen là gen mã hoá glutamat dehydrogenaza hoặc cả hai gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza.

[10] Phương pháp theo điểm [8], trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã

hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được đưa vào nấm men biến đổi gen là gen mã hoá xylitol dehydrogenaza, và trong đó bước nuôi cấy được thực hiện với sự có mặt của NAD⁺.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế này, nấm men biến đổi gen có khả năng sản xuất etanol từ xyloza được tạo ra.

Theo một phương án thực hiện của sáng chế này, sự biến đổi của nấm men được thực hiện bằng cách sử dụng các gen có trong chính nấm men, và do đó nấm men biến đổi gen theo sáng chế này không thuộc loại gen tái tổ hợp, và theo đó nó được ưu tiên nhờ các đặc điểm an toàn và dễ xử lý.

Hơn nữa, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có khả năng sản xuất etanol từ xyloza rất tốt, và do đó, khi sử dụng nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, etanol có thể được sản xuất từ xyloza một cách hữu hiệu.

Hơn nữa, nhận thấy rằng nhờ nấm men biến đổi gen theo sáng chế này giảm lượng sản phẩm phụ tạo ra như xylitol và glyxerol, nên khi etanol được sản xuất bằng cách sử dụng nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, có thể tránh được vấn đề tích tụ các sản phẩm phụ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế này sẽ được mô tả một cách chi tiết. Phạm vi của sáng chế này không chỉ giới hạn trong phần mô tả này. Ngoài các ví dụ dưới đây, sáng chế này có thể được cải biến thích hợp và được thực hiện bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực trong phạm vi mà hiệu quả của sáng chế này không bị giảm đi.

Hơn nữa, tất cả các công bố được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, các tài liệu kỹ thuật đã biết, các công bố đơn, công bố patent và các Tài liệu sáng chế khác được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

1. Tóm lược sáng chế

Sáng chế này dựa trên phát hiện việc nấm men biến đổi gen, mà tạo ra bằng cách biểu hiện quá mức gen sorbitol dehydrogenaza 1 (SOR1) và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza 2 (GDH2) trong vật chủ nấm men mà trong đó hoạt

tính của gen nội sinh đồng hoá xyloza thu được từ chính nấm men được tăng lên để tạo ra khả năng đồng hoá xyloza cho nấm men, mà có khả năng sản xuất ethanol rất tốt.

Hơn nữa, trong sáng chế này, đã phát hiện ra rằng lượng sản phẩm phụ tạo ra như xylitol và glyxerol được giảm xuống trong chủng biểu hiện quá mức GDH2 thu được bằng cách đưa GDH2 vào vật chủ nấm men. GDH2 là gen glutamat dehydrogenaza mà chuyển hoá NADH mà là dạng khử của NAD⁺ thành dạng NAD⁺, và do đó, đã cho thấy rằng NAD⁺ liên quan đến sự ngăn ngừa việc tạo ra các sản phẩm phụ. Vì lý do này, có thể cho rằng, cũng bằng cách nuôi cấy chủng biểu hiện quá mức SOR1 thu được bằng cách đưa SOR1 vào vật chủ nấm men với sự có mặt của NAD⁺ hoặc đồng biểu hiện SOR1 và GDH2 trong vật chủ nấm men, lượng sản phẩm phụ tạo ra được giảm xuống như trong trường hợp chủng biểu hiện quá mức GDH2.

Một đặc tính của nấm men biến đổi gen theo sáng chế này là việc nó được tạo ra bằng cách sử dụng vật chủ nấm men có gen đồng hoá xyloza, ưu tiên là gen đồng hoá xyloza của chính nấm men được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nó. Cụm từ “gen đồng hoá xyloza” là gen mã hoá protein có khả năng đồng hoá xyloza. Trong sáng chế này, gen đồng hoá xyloza được đưa vào vật chủ nấm men là ít nhất ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza.

Hơn nữa, theo một phương án thực hiện của sáng chế này, một đặc tính của nấm men biến đổi gen theo sáng chế này là việc nó được tạo ra bằng cách đưa gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và/hoặc gen mã hoá glutamat dehydrogenaza, ưu tiên là gen sorbitol dehydrogenaza 1 (SOR1) và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza 2 (GDH2) vào vật chủ nấm men. Theo một phương án thực hiện khác của sáng chế này, các gen được đưa vào vật chủ nấm men là các gen thu được từ vật chủ nấm men.

Hơn nữa, theo một phương án thực hiện khác của sáng chế này, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này khác biệt ở lượng các sản phẩm phụ tạo ra là thấp.

Trong số các nấm men, có các nấm men không có khả năng đồng hoá

pentoza như xyloza bởi vì nhóm các enzym đồng hoá xyloza không phải là nhóm có chức năng chính, tức là, chúng nằm ở trạng thái ngủ. Ví dụ, các nấm men thuộc loài *Saccharomyces* có nhóm các gen mã hoá nhóm các enzym đồng hoá xyloza, nhưng không thể sản xuất etanol từ xyloza.

Với loại nấm men mà được coi là không có khả năng sản xuất etanol này, gen đồng hoá xyloza thu được từ nấm men được đưa vào, nhờ đó nâng cao hoạt tính của gen nội sinh đồng hoá xyloza và tạo ra khả năng đồng hoá xyloza cho nó. Theo đó, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể là nấm men có gen mã hoá xyloza reductaza (XR), gen mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) và gen mã hoá xyluloza kinaza (XK) được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó. Hơn nữa, ngạc nhiên là, trong trường hợp của nấm men biến đổi gen tạo ra bằng cách biểu hiện quá mức gen sorbitol dehydrogenaza 1 (SOR1) và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza 2 (GDH2) trong nấm men có gen đồng hoá xyloza thu được từ nấm men được đưa vào, khả năng sản xuất etanol từ xyloza được cải thiện so với chủng đối chứng. Ngoài ra, lượng sản phẩm phụ tạo ra được giảm xuống ở các điều kiện nuôi cấy định trước. Tức là, theo sáng chế này, trong nấm men được xem là không có khả năng sản xuất etanol, etanol có thể được sản xuất một cách hữu hiệu từ xyloza. Hơn nữa, trong trường hợp của nấm men biến đổi gen theo sáng chế này thu được bằng cách đưa ba loại gen nêu trên vào trên nhiễm sắc thể dưới dạng gen liên kết của XR và XDH và gen liên kết của XDH và XK, khả năng sản xuất etanol từ xyloza được cải thiện. Bằng cách sử dụng dạng các gen liên kết, trong số ba gen nêu trên, số lượng gen mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nấm men có thể được nâng cao.

Sáng chế này còn đề cập đến phương pháp sản xuất etanol, bao gồm việc nuôi cấy nấm men biến đổi gen nêu trên để thu etanol từ môi trường nuôi cấy thu được. Theo sáng chế này, lượng các sản phẩm phụ tạo ra có thể được giảm đáng kể so với phương pháp thông thường.

2. Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này

Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này là nấm men được tạo ra bằng cách đưa vào theo chức năng ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá glutamat dehydrogenaza, ưu tiên là ít nhất một gen được chọn từ gen sorbitol dehydrogenaza 1 (SOR1) và gen glutamat

dehydrogenaza 2 (GDH2) vào vật chủ nấm men có gen đồng hoá xyloza đã được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nó.

Hơn nữa, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể là nấm men có gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó.

(1) Vật chủ nấm men có gen đồng hoá xyloza được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nó

Trong sáng chế này, nấm men là đối tượng để đưa gen vào hoặc biến đổi ưu tiên là nấm men không có khả năng đồng hoá pentoza như xyloza. Liên quan đến loại nấm men nêu trên, nó được cung cấp đủ khi nó không có khả năng đồng hoá pentoza trước khi đưa gen vào hoặc sự biến đổi, và nấm men có khả năng đồng hoá hexoza như glucoza. Cụm từ “khả năng đồng hoá pentoza” để chỉ khả năng sinh trưởng bằng cách sử dụng pentoza như xyloza làm nguồn cacbon. Các nấm men có khả năng đồng hoá pentoza có thể sinh trưởng trong môi trường mà chỉ pentoza được bổ sung vào làm nguồn cacbon, và do đó, khả năng đồng hoá pentoza có thể được khẳng định bằng cách đo độ đục ở bước sóng 600 nm, 660 nm hoặc tương tự chỉ mức độ sinh trưởng của nấm men trong môi trường mà chỉ pentoza được bổ sung làm nguồn cacbon.

Trong sáng chế này, nấm men mà không có khả năng đồng hoá pentoza không bị giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ của nó bao gồm các nấm men thuộc loài *Saccharomyces*. Các ví dụ về các nấm men thuộc loài *Saccharomyces* bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* như chủng CEN.PK2-1C. Hơn nữa, trong sáng chế này, để dùng làm nấm men là đối tượng để đưa gen vào hoặc được biến đổi, không chỉ là nấm men đơn bội, mà còn là nấm men lưỡng bội có thể được sử dụng. Nấm men lưỡng bội này rất tốt dùng làm nấm men ứng dụng, và các ví dụ của nó bao gồm các nấm men rượu sakê Kyokai như chủng nấm men rượu sakê Kyokai Số 7, các nấm men rượu shochu như chủng nấm men rượu shochu S-2, các nấm men rượu vang, chủng Red Star và chủng Taiken Số 396.

Hơn nữa, trong sáng chế này, nấm men là mục tiêu để đưa gen vào hoặc biến đổi ưu tiên là nấm men bia chịu etanol, và các ví dụ về các nấm men này bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể, các nấm men thuộc loài

Saccharomyces (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*).

Theo đó, trong sáng chế này, nấm men là đối tượng để đưa gen vào hoặc được biến đổi ưu tiên là nấm men thuộc loài *Saccharomyces*, và ưu tiên hơn nữa là *Saccharomyces cerevisiae*.

Trong sáng chế này, gen đồng hoá xyloza cần được xen vào trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, và ưu tiên là ba gen, là GRE3 (gen aldo-keto reductaza 3), SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza 1) và XKS1 (gen xyluloza kinaza). Trong sáng chế này, dùng làm gen đồng hoá xyloza, gen bất kỳ trong số gen ngoại sinh và gen nội sinh có thể được sử dụng, nhưng gen nội sinh được ưu tiên. Cụm từ “gen nội sinh” để chỉ gen có trong nấm men là đối tượng để xen gen vào, gen thu được từ nấm men là đối tượng để xen gen vào và gen thu được từ nấm men cùng loài với nấm men là đối tượng để xen gen vào. Theo đó, nấm men có gen nội sinh được đưa vào không thuộc loại tái tổ hợp.

Dùng làm gen mã hoá xyloza reductaza của nấm men, GRE3, YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 và YDR124w được biết đến. Theo đó, trong sáng chế này, dùng làm gen mã hoá xyloza reductaza, GRE3, YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 hoặc YDR124w có thể được sử dụng. Trong bản mô tả này, gen mã hoá xyloza reductaza được mô tả bằng cách sử dụng GRE3 làm ví dụ của nó, nhưng phần mô tả liên quan đến GRE3 trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 và YDR124w, và các gen này có thể được sử dụng theo cùng một cách thức trong sáng chế này.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể thu được thông tin về trình tự nucleotit của GRE3, YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 và YDR124w từ cơ sở dữ liệu phổ biến như Genbank. Các số đăng ký liên quan đến thông tin về trình tự này của các gen tương ứng của *Saccharomyces cerevisiae* được mô tả dưới đây.

GRE3: U00059, YJR096w: Z49596, YPR1: X80642, GCY1: X13228, ARA1: M95580, và YDR124w: Z48758

Trong sáng chế này, GRE3 (gen aldo-keto reductaza 3) là gen bao gồm các trình tự nucleotit mã hoá aldo-keto reductaza, và ví dụ, nó là ADN bao gồm

trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* hoặc ADN mã hoá protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Đã biết là protein mã hoá bởi GRE3 cũng có chức năng làm xyloza reductaza ở nấm men.

Trong sáng chế này, GRE3 có thể thu được, ví dụ, từ lưu trữ nấm men hoặc lưu trữ bộ gen bằng kỹ thuật khuếch đại gen, bằng cách sử dụng đoạn môi thiết kế dựa trên trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.

GRE3 cần được sử dụng trong sáng chế này bao gồm gen mã hoá thể đột biến của protein GRE3. Gen mã hoá thể đột biến của protein GRE3 bao gồm, ví dụ, ADN lai với ADN bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 ở các điều kiện nghiêm ngặt và mã hoá protein có hoạt tính xyloza reductaza. Hoạt tính của xyloza reductaza sẽ được mô tả dưới đây.

ADN mã hoá thể đột biến của Protein GRE3 có thể thu được từ lưu trữ ADN bổ trợ và lưu trữ bộ gen bằng phương pháp lai thông thường như phương pháp lai khuôn lạc, phương pháp lai đĩa, phương pháp thẩm tách ADN, bằng cách sử dụng ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn gen của nó làm đoạn dò. Liên quan đến phương pháp để tạo lưu trữ, ấn phẩm “Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th ed.” (Cold Spring Harbor Press (2012)), v.v. có thể được nêu ra. Hơn nữa, lưu trữ ADN bổ trợ và lưu trữ bộ gen có sẵn trên thị trường có thể được sử dụng.

Về mặt này, các điều kiện rửa sau khi lai, các ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm “2×SSC, 0,1% SDS, 42°C” và “1×SSC, 0,1% SDS, 37°C”, và các ví dụ của điều kiện nghiêm ngặt hơn bao gồm “1×SSC, 0,1% SDS, 65°C” và “0,5×SSC, 0,1% SDS, 50°C”.

Quá trình lai có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường. Liên quan đến phương pháp lai, ví dụ, các ấn phẩm “Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th ed.” (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)), “Current Protocols in Molecular Biology” (John Wiley & Sons (1987-1997)), v.v. có thể được đề cập đến.

Hơn nữa, trong bản mô tả này, ADN lai ở các điều kiện nghiêm ngặt bao

gồm, ví dụ, ADN bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 50%, ưu tiên là ít nhất 70%, 80% hoặc 85%, ưu tiên hơn nữa là ít nhất 90%, 95%, 96%, 97% hoặc 98%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là ít nhất 99%, còn ưu tiên hơn nữa là ít nhất 99,7%, và đặc biệt ưu tiên là 99,9% đồng nhất (tương đồng) với trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1. Giá trị biểu thị tính đồng nhất có thể được tính toán bằng cách sử dụng chương trình thông thường như BLAST.

Hơn nữa, các ví dụ về ADN lai với ADN bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 ở các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm ADN có trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 có dạng đột biến như mất đoạn, thay thế hoặc bổ sung một hoặc một số axit nucleic. Các ví dụ về các ADN này bao gồm: (i) ADN trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) bazơ trong trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 bị mất; (ii) ADN trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) bazơ trong trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng bazơ khác; (iii) ADN trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) bazơ được bổ sung vào trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1; và (iv) ADN trong đó các dạng đột biến nêu trên kết hợp, mỗi ADN mã hoá protein có hoạt tính xyloza reductaza.

Trong sáng chế này, việc xác nhận trình tự nucleotit có thể được thực hiện bằng sự giải trình tự theo phương pháp thường dùng. Ví dụ, nó có thể được thực hiện theo phương pháp kết thúc chuỗi dideoxynucleotit (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) hoặc tương tự. Cũng có thể sử dụng máy giải trình tự ADN thích hợp để phân tích trình tự.

Trong sáng chế này, ví dụ, GRE3 (gen aldo-keto reductaza 3) thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* bao gồm các gen mã hoá protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Trong sáng chế này, gen mã hoá protein GRE3 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* hoặc thể đột biến của nó cũng chứa trong GRE3 (gen aldo-keto reductaza 3).

Các ví dụ về thể đột biến của protein GRE3 bao gồm: (i) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3,

và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 bị mất; (ii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng các axit amin khác; (iii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin được bổ sung vào trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2; và (iv) protein trong đó các dạng đột biến nêu trên là kết hợp, mỗi protein có hoạt tính xyloza reductaza.

Về mặt này, cụm từ “hoạt tính xyloza reductaza” để chỉ hoạt tính để chuyển hoá xyloza thành xylitol với sự có mặt của NAD⁺ (hoặc NADP⁺). Trong sáng chế này, mức độ hoạt tính của xyloza reductaza của thể đột biến của protein GRE3 không bị giới hạn cụ thể miễn là thể đột biến có hoạt tính xyloza reductaza, nhưng ví dụ, nó là đủ khi thể đột biến có khoảng 10% hoặc hơn hoạt tính của protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Hoạt tính của xyloza reductaza của protein có thể đo được bằng phương pháp thông thường.

Đã biết là nấm men có SOR1, SOR2 và YLR070c dùng làm gen mã hoá xylitol dehydrogenaza. Theo đó, trong sáng chế này, dưới dạng gen mã hoá xylitol dehydrogenaza, SOR1, SOR2 hoặc YLR070c có thể được sử dụng. Trong bản mô tả này, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được mô tả bằng cách sử dụng SOR1 làm ví dụ của nó, nhưng phần mô tả liên quan đến SOR1 trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho SOR2 hoặc YLR070c, và các gen này có thể được sử dụng theo cùng một phương thức trong sáng chế này.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể thu được thông tin trình tự nucleotit của SOR1, SOR2 và YLR070c từ cơ sở dữ liệu thông thường như Genbank. Các số đăng ký liên quan đến thông tin trình tự của các gen tương ứng của *Saccharomyces cerevisiae* được mô tả dưới đây.

SOR1: L11039, SOR2: Z74294, và YLR070c: Z73242

Trong sáng chế này, SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza 1) là gen bao gồm trình tự nucleotit mã hoá sorbitol dehydrogenaza, và ví dụ, nó là ADN bao

gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* hoặc ADN mã hoá protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Đã biết là protein mã hoá bởi SOR1 cũng có chức năng làm xylitol dehydrogenaza ở nấm men.

SOR1 cần được sử dụng trong sáng chế này bao gồm gen mã hoá thể đột biến của protein SOR1. Gen mã hoá thể đột biến của protein SOR1 bao gồm, ví dụ, ADN lai với ADN bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* ở các điều kiện nghiêm ngặt và mã hoá protein có hoạt tính xylitol dehydrogenaza.

Hơn nữa, SOR1 cần được sử dụng trong sáng chế này có thể là gen mã hoá thể đột biến của các protein SOR1 sau: (i) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 bị mất; (ii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được thay thế bằng các axit amin khác; (iii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin được bổ sung vào trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 4; và (iv) protein trong đó các dạng đột biến nêu trên được kết hợp, mỗi protein có hoạt tính xylitol dehydrogenaza.

Về mặt này, cụm từ “hoạt tính xylitol dehydrogenaza” để chỉ hoạt tính xylitol dehydrogenaza để tạo ra xyluloza. Trong sáng chế này, mức độ hoạt tính xylitol dehydrogenaza của thể đột biến của protein SOR1 không bị giới hạn cụ thể miễn là thể đột biến có hoạt tính xylitol dehydrogenaza, nhưng ví dụ, nó là đủ khi thể đột biến có khoảng 10% hoặc hơn hoạt tính của protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Hoạt tính xylitol dehydrogenaza của protein có thể đo được bằng phương pháp thông thường.

Liên quan đến các ADN chứa trong ADN lai nêu trên, các điều kiện lai, v.v., có thể áp dụng cách giải thích nêu trên vào đó. Hơn nữa, trong sáng chế này, SOR1 có thể thu được hoặc sản xuất theo cùng phương pháp với GRE3 mô tả ở đây.

Dùng làm gen mã hoá xyluloza kinaza, XKS1 (gen xyluloza kinaza 1) có thể được sử dụng. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể thu được thông tin trình tự nucleotit của XKS1 từ cơ sở dữ liệu thông thường như Genbank. Ví dụ, số đăng ký của XKS1 của *Saccharomyces cerevisiae* là Z72979.

Trong sáng chế này, XKS1 (gen xyluloza kinaza 1) là gen bao gồm trình tự nucleotit mã hoá xyluloza kinaza, và ví dụ, nó là ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* hoặc ADN mã hoá protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 6.

XKS1 cần được sử dụng trong sáng chế này bao gồm gen mã hoá thể đột biến của protein XKS1. Gen mã hoá thể đột biến của protein XKS1 bao gồm, ví dụ, ADN lai với ADN bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* ở các điều kiện nghiêm ngặt và mã hoá protein có hoạt tính xyluloza kinaza.

Hơn nữa, XKS1 cần được sử dụng trong sáng chế này có thể là gen mã hoá thể đột biến của các protein XKS1 sau: (i) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 bị mất; (ii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng các axit amin khác; (iii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin được bổ sung vào trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 6; và (iv) protein trong đó các dạng đột biến nêu trên được kết hợp, mỗi protein có hoạt tính xyluloza kinaza.

Về mặt này, cụm từ “hoạt tính xyluloza kinaza” để chỉ hoạt tính phosphorylat xyluloza. Trong sáng chế này, mức độ hoạt tính xyluloza kinaza của thể đột biến của protein XKS1 không bị giới hạn cụ thể miễn là thể đột biến có hoạt tính xyluloza kinaza, nhưng ví dụ, nó là đủ khi thể đột biến có khoảng 10% hoặc hơn hoạt tính của protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 6. Hoạt tính xyluloza kinaza của protein có thể đo được bằng phương

pháp thông thường.

Liên quan đến các ADN chứa trong ADN lai nêu trên, các điều kiện lai, v.v., có thể áp dụng cách giải thích nêu trên vào đó. Hơn nữa, trong sáng chế này, XKS1 có thể thu được hoặc sản xuất theo cùng phương pháp như phương pháp dùng cho GRE3 mô tả ở đây.

Trong sáng chế này, vật chủ nấm men theo sáng chế này có thể thu được bằng cách xen ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1, mà là các gen đồng hoá xyloza, vào trên nhiễm sắc thể của nấm men. Bằng cách xen các gen nội sinh đồng hoá xyloza nêu trên vào trên nhiễm sắc thể của nấm men, hoạt tính của xyloza reductaza, xylitol dehydrogenaza và xyluloza kinaza của chính nấm men được cải thiện so với trước khi đưa gen vào, và nó có thể tạo ra khả năng đồng hoá xyloza cho nấm men.

Trong sáng chế này, nấm men không phải thể tái tổ hợp ưu tiên được dùng làm vật chủ nấm men. Để tạo ra nấm men không phải thể tái tổ hợp, gen đồng hoá xyloza cần được đưa vào trên nhiễm sắc thể nấm men phải là gen thu được từ cùng loài với nấm men. Hơn nữa, nấm men mà trong đó gen được đưa vào phải là nấm men cùng loài từ đó gen thu được.

Trong sáng chế này, ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, ưu tiên là GRE3, SOR1 và XKS1 được xen vào trên nhiễm sắc thể của nấm men, ưu tiên là cùng loài. Các gen này có thể được xen riêng biệt vào trên nhiễm sắc thể, hoặc có thể được xen vào trên nhiễm sắc thể dưới dạng casset biểu hiện được tạo ra bằng cách liên kết các gen thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu. Khi liên kết các gen thành đoạn nối tiếp, trật tự bố trí của ba gen không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng kiểu kết hợp bất kỳ. Theo cách khác, plasmit bao gồm ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1 có thể được sử dụng để đưa các gen vào trên nhiễm sắc thể của nấm men. Ba gen nêu trên có thể được gắn vào một plasmit, hoặc có thể lần lượt chứa trong các plasmit khác nhau. Hơn nữa, số lượng mỗi gen cần được xen vào không bị giới hạn, và là một hoặc nhiều hơn một. Thứ tự đưa các gen vào trên nhiễm sắc thể không bị giới hạn cụ thể.

Ba gen đồng hoá xyloza có thể được xen vào trên nhiễm sắc thể của nấm

men dưới dạng gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xyloza reductaza (XR) và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) thành đoạn nối tiếp và gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) và gen mã hoá xyluloza kinaza (XK) thành đoạn nối tiếp. Tức là sáng chế này bao gồm nấm men biến đổi gen, trong đó ba gen đồng hoá xyloza nêu trên được xen vào trên nhiễm sắc thể dưới dạng gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xyloza reductaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza. Ví dụ, các gen đồng hoá xyloza có thể được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nấm men bằng cách sử dụng plasmit bao gồm gen liên kết của GRE3-SOR1 và plasmit bao gồm gen liên kết của SOR1-XKS1. Trật tự bố trí của các gen trong các gen liên kết không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, gen thu được bằng cách liên kết XR và XDH có thể là XR-XDH hoặc XDH-XR. Tương tự, gen thu được bằng cách liên kết XDH và XK có thể là XDH-XK hoặc XK-XDH. Khi sử dụng cassette gen nêu trên thu được bằng cách liên kết các gen, mức độ biểu hiện của gen mã hoá xylitol dehydrogenaza (SOR1) đặc biệt được nâng cao. Nấm men biến đổi gen này khả năng đồng hoá xyloza đặc biệt tốt và có thể sản xuất etanol từ xyloza một cách hữu hiệu.

Vị trí của nhiễm sắc thể mà trên đó các gen được xen vào ưu tiên là vị trí không có chức năng ở nấm men, và các ví dụ của nó bao gồm, nhưng không giới hạn ở, locus XYL2 (Genbank Accession Số Z73242), locus HXT13 và locus HXT17. Cũng có thể xen các gen vào vị trí trên nhiễm sắc thể mà không mã hoá bất kỳ gen nào. Các ví dụ về vị trí trên nhiễm sắc thể mà không mã hoá gen bất kỳ bao gồm trình tự δ mà là một trong các yếu tố Ty. Đã biết là nhiều các trình tự δ (khoảng 100 bản sao) có mặt trên nhiễm sắc thể của nấm men. Vị trí và thông tin trình tự của trình tự δ trên nhiễm sắc thể nấm men đã được phổ biến (ví dụ, ấn phẩm Science 265, 2077 (1994)). Ví dụ, bằng cách đưa plasmit thu được bằng cách xen gen đồng hoá xyloza vào đoạn giữa của trình tự δ vào nấm men, một hoặc nhiều bản sao của gen có thể được xen vào vị trí đích trên nhiễm sắc thể. Cũng có thể xen gen vào trình tự σ hoặc trình tự τ , mỗi trình tự cũng là yếu tố Ty, thay vì trình tự δ . Hơn nữa, cũng có thể xen gen vào vị trí gen ribosom như NTS2.

Việc tạo ra casset hoặc plasmit để xen các gen vào trên nhiễm sắc thể, việc lựa chọn vị trí xen vào nhiễm sắc thể, việc xen vào trên nhiễm sắc thể (ví dụ, phương pháp lithi axetat) có thể được thực hiện một cách thích hợp bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực dựa trên các phương pháp thông thường. Sáng chế này bao gồm casset biểu hiện hoặc plasmit thu được bằng cách liên kết ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1, thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu. Các ví dụ về các plasmit này bao gồm plasmit thu được bằng cách liên kết GRE3 và SOR1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu (ví dụ, PGK promoter) và plasmit thu được bằng cách liên kết SOR1 và XKS1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu. Hai gen được liên kết cùng nhau sao cho mỗi gen có thể được biểu hiện khi được xen vào trên nhiễm sắc thể. Khi liên kết hai gen cùng nhau để tạo ra gen liên kết, trình tự liên kết, vị trí enzym giới hạn hoặc tương tự có thể được bổ sung thích hợp vào đó khi cần. Thao tác này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật xử lý gen đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bằng cách sử dụng các plasmit này, ba dạng gen đồng hoá xyloza có thể được đưa vào trên nhiễm sắc thể của nấm men.

Hơn nữa, plasmit cần được sử dụng trong sáng chế này không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể đưa các gen vào trên nhiễm sắc thể của nấm men. Ví dụ, vector có sẵn trên thị trường như pUC18 có thể được sử dụng.

Khả năng sử dụng xyloza không được tạo ra cho nấm men không có khả năng đồng hoá pentoza trừ phi cả ba gen, là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza được biểu hiện. Theo đó, bằng cách nuôi cấy nấm men đã được đưa gen vào như nêu trên trong môi trường chứa xyloza (không có etanol), nấm men biến đổi gen có thể được tuyển chọn.

Nhờ đó, vật chủ nấm men theo sáng chế này có thể được tạo ra bằng cách đưa ba gen, là GRE3, SOR1 và XKS1 vào trên nhiễm sắc thể của nấm men.

Vật chủ nấm men theo sáng chế này ưu tiên là bao gồm ba gen nội sinh đồng hoá xyloza, là GRE3, SOR1 và XKS1 nội sinh trên nhiễm sắc thể của nó, và do đó, sự biểu hiện của GRE3, SOR1 và XKS1 có thể được hoạt hoá. Về mặt này, “để hoạt hoá sự biểu hiện của các gen đồng hoá xyloza” nghĩa là các gen tồn tại trong vật chủ nấm men được hoạt hoá ở dạng biểu hiện để tạo ra tình

trạng mà protein mục tiêu có thể được biểu hiện một cách thích hợp. Hơn nữa, do sự biểu hiện của các gen đồng hoá xyloza có thể được hoạt hoá trong vật chủ nấm men theo sáng chế này, nấm men có thể có khả năng đồng hoá xyloza. Theo đó, vật chủ nấm men theo sáng chế này có thể là nấm men mà có khả năng đồng hoá xyloza, và ưu tiên là nấm men bia mà có khả năng đồng hoá xyloza.

(2) Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này

Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này là nấm men, trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza, ưu tiên là ít nhất một gen được chọn từ GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza 2) và SOR1 nêu trên (gen sorbitol dehydrogenaza 1) được đưa vào theo chức năng vào vật chủ nấm men nêu trên.

Trong sáng chế này, dùng làm gen mã hoá glutamat dehydrogenaza, GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza 2) có thể được sử dụng. GDH2 là enzym mà sử dụng NAD làm coenzym.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể thu được thông tin trình tự nucleotit của GDH2 từ cơ sở dữ liệu thông thường như Genbank. Số đăng ký của GDH2 của *Saccharomyces cerevisiae* là S66436.

Trong sáng chế này, GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza 2) là gen bao gồm trình tự nucleotit mã hoá glutamat dehydrogenaza, và ví dụ, nó là ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* hoặc ADN mã hoá protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 8.

GDH2 cần được sử dụng trong sáng chế này bao gồm gen mã hoá thể đột biến của Protein GDH2. Gen mã hoá thể đột biến của Protein GDH2 bao gồm, ví dụ, ADN lai với ADN bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với ADN bao gồm trình tự nucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 thu được từ *Saccharomyces cerevisiae* ở các điều kiện nghiêm ngặt và mã hoá protein có hoạt tính glutamat dehydrogenaza.

Hơn nữa, GDH2 cần được sử dụng trong sáng chế này có thể gen mã hoá thể đột biến của các protein GDH2 sau đây: (i) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu

tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 bị mất; (ii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin trong trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 được thay thế bằng các axit amin khác; (iii) protein trong đó một hoặc một số (ví dụ, 1 đến 10, ưu tiên là 1 đến 5, ưu tiên hơn nữa là 1 đến 3, và thậm chí ưu tiên hơn nữa là 1 đến 2) các axit amin được bổ sung vào trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 8; và (iv) protein trong đó các dạng đột biến nêu trên được kết hợp, mỗi protein có hoạt tính glutamat dehydrogenaza.

Về mặt này, cụm từ “hoạt tính glutamat dehydrogenaza” để chỉ hoạt tính để thực hiện chuyển hoá qua lại giữa glutamic axit và α -ketoglutaric axit. Trong sáng chế này, mức độ hoạt tính glutamat dehydrogenaza của thể đột biến của protein GDH2 không bị giới hạn cụ thể miễn là thể đột biến có hoạt tính glutamat dehydrogenaza, nhưng ví dụ, nó là đủ khi thể đột biến có khoảng 10% hoặc hơn hoạt tính của protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 8. Hoạt tính glutamat dehydrogenaza của protein có thể đo được bằng phương pháp thông thường.

Liên quan đến các ADN chứa trong ADN lai nêu trên, các điều kiện lai, v.v., có thể áp dụng cách giải thích nêu trên vào đó. Hơn nữa, trong sáng chế này, GDH2 có thể thu được hoặc sản xuất theo cùng phương pháp với phương pháp nêu trên.

Trong sáng chế này, thay vì SOR1 được đưa vào vật chủ nấm men, SOR2 hoặc YLR070c nêu trên có hoạt tính xylitol dehydrogenaza cũng có thể được sử dụng. Phần mô tả liên quan đến SOR1 trong bản mô tả này cũng có thể dùng cho SOR2 và YLR070c, và các gen này có thể được sử dụng theo cùng cách thức trong sáng chế này.

Gen cần được đưa vào tế bào chủ theo sáng chế này ưu tiên là trình tự gen nội sinh của vật chủ nấm men, nhưng nó cũng có thể là gen ngoại sinh.

Trong sáng chế này, SOR1 được đưa vào theo chức năng vật chủ nấm men. Theo cách khác, trong sáng chế này, GDH2 được đưa vào theo chức năng vật chủ nấm men. Theo cách khác, trong sáng chế này, cả SOR1 và GDH2 được

đưa vào vật chủ nấm men theo chức năng. Quá trình đưa gen vào có thể được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit bao gồm gen đích ở dạng biểu hiện. Khi đưa cả SOR1 và GDH2 vào vật chủ nấm men, SOR1 và GDH2 có thể được gắn vào một plasmit, hoặc có thể tương ứng chứa trong các plasmit khác nhau. Sáng chế này bao gồm plasmit bao gồm các gen này.

Plasmit cần được sử dụng trong sáng chế này có thể được tạo ra bằng cách xen theo chức năng các gen nêu trên vào vector để biểu hiện nấm men. Để xen các gen vào vector, phản ứng ligaza, phản ứng topoisomeraza hoặc tương tự có thể được sử dụng. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp, trong đó: ADN đã lọc sạch được phân cắt bằng enzym giới hạn thích hợp; và đoạn ADN thu được được xen vào vị trí enzym giới hạn thích hợp, vị trí tạo dòng hoặc tương tự trong vector được liên kết với vector.

Plasmit cần được sử dụng trong sáng chế này không bị giới hạn cụ thể theo nguồn gốc của vector làm nền của plasmit. Ví dụ, plasmit thu được từ *Escherichia coli*, plasmit thu được từ *Bacillus subtilis*, plasmit thu được từ nấm men, v.v., có thể được sử dụng. Ví dụ, vector có sẵn trên thị trường như pGADT7 và pAUR135 cũng có thể được sử dụng.

Plasmit theo sáng chế này có thể bao gồm vị trí tạo dòng, gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kết thúc, gen đánh dấu chọn lọc, cassette, v.v., miễn là gen đích có thể được biểu hiện. Hơn nữa, vị trí enzym giới hạn hoặc tác nhân liên kết có thể bổ sung một cách thích hợp vào đó nếu cần khi xen ADN. Thao tác này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật xử lý gen đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Gen khởi đầu có thể được kết hợp vào phía trước gen đích. Gen khởi đầu không bị giới hạn cụ thể miễn là protein đích có thể được biểu hiện một cách thích hợp trong thể biến nạp. Ví dụ, gen khởi đầu PGK, gen khởi đầu ADH, gen khởi đầu TDH, gen khởi đầu ENO, v.v., có thể được sử dụng.

Gen kết thúc có thể được kết hợp vào phía sau gen đích.

Trong sáng chế này, để biểu hiện hiệu quả gen đích ở nấm men, ưu tiên là sử dụng gen khởi đầu PGK và/hoặc gen kết thúc PGK.

Các ví dụ về gen đánh dấu chọn lọc bao gồm gen kháng thuốc như gen

kháng ampicilin, gen kháng kanamycin, gen kháng neomycin và gen kháng hygromycin, gen reductaza dihydrofolat, gen synthetaza loxin, và gen synthetaza uraxil.

Trong trường hợp mà casset gen tổng hợp của axit amin như loxin, histidin và tryptophan hoặc casset gen tổng hợp uraxil được chứa trong vector, nấm men biến đổi gen có thể được chọn lọc bằng cách nuôi cấy nấm men trong môi trường mà không chứa axit amin hoặc uraxil.

Nấm men biến đổi gen có thể được tạo ra bằng cách đưa plasmit theo sáng chế này vào vật chủ nấm men theo sáng chế này mà là đích của quá trình đưa gen vào.

Phương pháp để đưa plasmit theo sáng chế này vào vật chủ nấm men không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ của nó bao gồm các phương pháp thông thường như phương pháp lithi axetat, phương pháp mở lỗ bằng điện, phương pháp canxi phosphat, phương pháp thể mỡ và phương pháp DEAE-dextran. Nhờ các phương pháp này, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này được tạo ra.

Hơn nữa, nấm men biến đổi gen thu được by incorporating GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza 2) và SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza 1) vào trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men bằng tái tổ hợp đồng dạng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế này. Khi xen các gen vào trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men, vị trí xen vào không bị giới hạn cụ thể. Hơn nữa, phương pháp để xen theo chức năng GDH2 và SOR1 vào trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men không bị giới hạn, và ví dụ, phương pháp sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen thông thường có thể được sử dụng.

Hơn nữa, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể là nấm men biến đổi gen trong đó sự biểu hiện của GDH2 hoặc SOR1 của tế bào chủ đã được hoạt hoá. Cụ thể là, sáng chế này cũng bao gồm nấm men trong đó mức độ biểu hiện của GDH2 mà ban đầu có mặt trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men được nâng cao, và nấm men trong đó mức độ biểu hiện của SOR1 mà ban đầu có mặt trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men hoặc SOR1 được đưa vào vật chủ nấm men đã được nâng cao. GDH2 hoặc SOR1 được hoạt hoá ở dạng biểu hiện, ví dụ, bằng cách đưa vào từ bên ngoài gen khởi đầu hoặc bằng cách thay

thể gen khởi đầu của chính gen này bằng gen khởi đầu hiệu lực hơn, và nhờ đó protein đích có thể được biểu hiện một cách thích hợp.

Phương pháp để hoạt hoá sự biểu hiện của gen nội sinh không bị giới hạn, và các ví dụ của nó bao gồm phương pháp trong đó gen khởi đầu nhờ đó protein đích có thể được biểu hiện một cách thích hợp được kết hợp vào trên nhiễm sắc thể bằng thay thế gen bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen thông thường. Về phương pháp thay thế gen, phương pháp của Akada et al. *Yeast* 23: 399-405 (2006) (tài liệu phi sáng chế) có thể được sử dụng. Dùng làm gen khởi đầu cho quá trình thay thế, gen khởi đầu thông thường như gen khởi đầu PGK, gen khởi đầu ADH, gen khởi đầu TDH và gen khởi đầu ENO có thể được sử dụng.

3. Phương pháp sản xuất etanol

Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này thu được bằng cách đưa ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza, ví dụ, SOR1 và/hoặc GDH2 vào vật chủ nấm men mà có khả năng đồng hoá xyloza, và do đó, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có khả năng đồng hoá xyloza. Ngoài ra, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể sản xuất etanol từ xyloza.

Hơn nữa, vật chủ nấm men theo sáng chế này là nấm men mà có khả năng đồng hoá xyloza, và do đó có thể sản xuất etanol từ xyloza. Cụ thể, nấm men biến đổi gen, mà thu được bằng cách đưa cả gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xyloza reductaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza vào trên nhiễm sắc thể nấm men, là đặc biệt thích hợp để sản xuất etanol từ xyloza. Sau đây, phương pháp sản xuất etanol sẽ được giải thích bằng cách sử dụng trường hợp nấm men biến đổi gen theo sáng chế này làm ví dụ, nhưng nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có khả năng đồng hoá xyloza cũng có thể được sử dụng theo cùng cách thức như phương pháp sản xuất etanol.

Nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể được nuôi cấy theo phương pháp thường dùng để nuôi cấy nấm men. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể lựa chọn môi trường thích hợp từ các môi trường đã biết

như môi trường SD, môi trường SCX, môi trường YPD và môi trường YPX để nuôi cấy nấm men ở các điều kiện nuôi cấy ưu tiên. Trong trường hợp mà nấm men được nuôi cấy trong môi trường lỏng, phương pháp nuôi cấy lắc được ưu tiên.

Etanol có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy nấm men biến đổi gen theo sáng chế này và thu etanol từ môi trường nuôi cấy thu được.

Khi sản xuất etanol, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này được nuôi cấy với sự có mặt của 10 đến 150 g/L, ưu tiên là 70 g/L xyloza. Trước bước nuôi cấy chính, nấm men biến đổi gen có thể được nuôi cấy sơ bộ. Để nuôi cấy sơ bộ, ví dụ, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này được cấy vào lượng nhỏ môi trường và được nuôi cấy trong 12 đến 24 giờ. Dịch nuôi cấy sơ bộ với lượng 0,1 đến 10%, ưu tiên là 1% lượng môi trường nuôi cấy của bước nuôi cấy chính được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chính, và sau đó khởi động bước nuôi cấy chính. Bước nuôi cấy chính được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy lắc bằng cách sử dụng môi trường chứa xyloza trong 0,5 đến 200 giờ, ưu tiên là 10 đến 150 giờ, và ưu tiên hơn nữa là 24 đến 137 giờ, ở nhiệt độ 20 đến 40°C, và ưu tiên là 30°C.

Etanol tạo ra có thể thu được từ môi trường nuôi cấy mà đạt được bằng cách nuôi cấy nấm men theo sáng chế này theo cách thức nêu trên. Cụm từ “nuôi cấy” để chỉ dịch nuôi cấy (dịch nổi nuôi cấy), nấm men nuôi cấy, sản phẩm dạng mảnh nhỏ của nấm men nuôi cấy hoặc tương tự. Etanol có thể được tinh chế từ môi trường nuôi cấy theo phương pháp làm sạch thông thường, và sau đó được thu gom. Trong sáng chế này, etanol được tiết ra từ nấm men biến đổi gen chủ yếu đi vào dịch nổi nuôi cấy, và do đó, tốt hơn là thu etanol từ phần dịch nổi nuôi cấy.

Lượng tạo ra của etanol có thể được đo bằng cách phân tích etanol chứa trong môi trường bằng sắc ký lỏng, sắc ký khí hoặc kit đo etanol có sẵn trên thị trường.

Hơn nữa, bằng cách đo lượng tạo ra của etanol, khả năng sản xuất etanol của nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể được khẳng định.

Khi etanol được sản xuất nhờ sử dụng nấm men biến đổi gen thu được

bằng cách đưa gen mã hoá glutamat dehydrogenaza vào vật chủ nấm men theo sáng chế này (ví dụ, chủng biểu hiện quá mức GDH2 thu được bằng cách đưa GDH2 hoặc nấm men biến đổi gen thu được bằng cách đưa cả gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza vào vật chủ nấm men theo sáng chế này (ví dụ, GDH2 và Chủng biểu hiện quá mức SOR1 thu được bằng cách đưa cả hai GDH2 và SOR1) là nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, lượng xylitol và glyxerol sản xuất là các sản phẩm phụ được giảm xuống so với chủng đối chứng.

Khi nấm men biến đổi gen thu được bằng cách đưa gen mã hoá xylitol dehydrogenaza vào vật chủ nấm men theo sáng chế này (ví dụ, chủng biểu hiện quá mức SOR1 thu được bằng cách đưa SOR1) được sử dụng làm nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, bằng cách nuôi cấy nấm men trong môi trường chứa xyloza với sự có mặt của NAD⁺, lượng xylitol và glyxerol sản xuất là các sản phẩm phụ có thể giảm xuống so với chủng đối chứng. NAD⁺ có thể được bổ sung vào môi trường chứa xyloza để nồng độ cuối cùng của nó là 0.01 đến 10000 μ M, ưu tiên là 0,1 đến 1000 μ M, và ưu tiên hơn nữa là 1 đến 100 μ M.

NAD⁺ có thể có mặt trong hệ nuôi cấy trong toàn bộ thời gian nuôi cấy hoặc chỉ trong khoảng thời gian nuôi cấy nhất định. Theo đó, ví dụ, NAD⁺ có thể được bổ sung vào hệ nuôi cấy trước khi khởi động quá trình nuôi cấy hoặc sau một khoảng thời gian trôi qua định trước sau khi khởi động nuôi cấy.

Lượng xylitol và glyxerol sản xuất có thể được đo bằng cách phân tích xylitol hoặc glyxerol chứa trong môi trường bằng sắc ký lỏng, sắc ký khí hoặc kit đo có sẵn trên thị trường.

Hơn nữa, bằng cách đo lượng xylitol và glyxerol sản xuất, khả năng ngăn chặn sự tạo ra sản phẩm phụ và hiệu quả sản xuất etanol của nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có thể được khẳng định.

SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự nucleotit của GRE3 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 2 thể hiện trình tự axit amin của protein GRE3 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 3 thể hiện trình tự nucleotit của SOR1 của *Saccharomyces*

cerevisiae.

SEQ ID NO: 4 thể hiện trình tự axit amin của protein SOR1 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 5 thể hiện trình tự nucleotit của XKS1 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 6 thể hiện trình tự axit amin của protein XKS1 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 7 thể hiện trình tự nucleotit của GDH2 của *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 8 thể hiện trình tự axit amin của protein GDH2 của *Saccharomyces cerevisiae*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế này sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ minh họa, nhưng sáng chế này không bị giới hạn ở các ví dụ này. Tất cả các nấm men được sử dụng trong các Ví dụ là *Saccharomyces cerevisiae*.

Đo hoạt tính enzym

Hoạt tính của xyloza reductaza của GRE3 (aldo-keto reductaza 3), hoạt tính xylitol dehydrogenaza của SOR1 (sorbitol dehydrogenaza 1) và hoạt tính xyluloza kinaza của XKS1 (xyluloza kinaza 1) được đo trong các điều kiện mô tả dưới đây.

Chất chiết thô được điều chế từ tế bào nấm men nuôi cấy bằng cách sử dụng Chất chiết tách protein Y-PER (Pierce).

Dung dịch phản ứng có thành phần được thể hiện dưới đây được điều chế và sau đó được giữ ở 30°C trong 5 phút, và mức hấp thụ được đo. Liên quan đến GRE3 và XKS1, sự giảm mức hấp thụ ở 340 nm dựa trên sự oxy hoá của NADH được đo, và liên quan đến SOR1, sự tăng mức hấp thụ ở 340 nm dựa trên sự khử của NAD⁺ được đo. Nhờ đó đo được hoạt tính.

Thành phần của dung dịch phản ứng là như sau:

Aldo-keto reductaza (GRE3):

50 mM dung dịch đệm natri phosphat (độ pH 6,8)

0,2 mM NADPH

100 mM D-xyloza

Chất chiết thô

Sorbitol dehydrogenaza (SOR1):

50 mM Tris-HCl (pH 8,5)

1 mM NAD⁺

5 mM MgCl₂

100 mM xylitol

Chất chiết thô

Xyluloza kinaza (XKS1):

20 mM dung dịch đệm natri phosphat (độ pH 6,8)

100 mM KCl

5 mM MgCl₂

5 mM ATP

0,2 mM NADH

1 mM phosphoenolpyruvic axit

5U/ml kinaza pyruvat

7U/ml lactatdehydrogenaza

5 mM xyluloza

Chất chiết thô

Ví dụ 1

1. Sự tạo ra nấm men mà có khả năng đồng hoá xyloza

Các gen nội sinh đồng hoá xyloza là GRE3 (gen aldo-keto reductaza: sử dụng thay cho gen xyloza reductaza), SOR1 (gen sorbitol dehydrogenaza: sử dụng thay cho gen xylitol dehydrogenaza) và XKS1 (gen xyluloza kinaza) của

nấm men bia được liên kết cùng nhau thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1 để tạo ra cassette biểu hiện. Bằng cách sử dụng cassette biểu hiện tạo ra, các gen nêu trên được đưa vào locus XYL2 trên nhiễm sắc thể, nhờ đó thu được nấm men bia mà có khả năng đồng hoá xyloza.

2. Sự tạo ra chủng biểu hiện quá mức

SOR1 hoặc GDH2 (gen glutamat dehydrogenaza) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1 được kết hợp vào vectơ biểu hiện pAUR135 có sẵn trên thị trường (Takara Bio Inc.). Bằng cách sử dụng vectơ tái tổ hợp thu được, SOR1 hoặc GDH2 được đưa vào locus AUR1 trên nhiễm sắc thể của nấm men bia có khả năng đồng hoá xyloza tạo ra trong phần 1 nêu trên. Các chủng thu được lần lượt là chủng biểu hiện quá mức SOR1 và chủng biểu hiện quá mức GDH2. Hơn nữa, chủng trong đó chỉ vectơ được kết hợp vào tạo ra theo cùng cách thức, và nó được sử dụng làm chủng đối chứng trong thử nghiệm mô tả dưới đây.

3. Đánh giá khả năng lên men

Các chủng tạo ra trong phần 2 nêu trên được nuôi cấy sơ bộ với YPD (chứa 2% glucoza) và sau đó được nuôi cấy xoay tròn trong bình nón 50 ml chứa 15 ml môi trường biến đổi CBS chứa 5% xyloza (Tài liệu phi sáng chế: H. B. Klinke et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 738 (2003), độ pH 5.0) (lượng cấy ban đầu $OD_{600}=20$, 30°C, 140 vòng/phút), và việc lấy mẫu được thực hiện theo thời gian để đánh giá khả năng lên men. Sản phẩm chuyển hoá của quá trình lên men được định lượng bằng HPLC bằng cách sử dụng cột Shodex SUGAR SP0810. Nồng độ tế bào được đo bằng quang phổ kế ($\lambda=600$ nm).

4. Kết quả đánh giá khả năng lên men

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1. Mức độ tiêu thụ xyloza của chủng biểu hiện quá mức SOR1 là giống với chủng đối chứng, lượng etanol sản xuất của chủng biểu hiện quá mức SOR1 được cải thiện so với chủng đối chứng, và lượng xylitol và glyxerol sản xuất là các sản phẩm phụ của chủng biểu hiện quá mức SOR1 được giảm nhẹ so với chủng đối chứng. Trong trường hợp chủng biểu hiện quá mức GDH2, lượng xylitol và glyxerol sản xuất là các sản phẩm phụ được giảm xuống, và lượng etanol sản xuất được cải thiện.

Bảng 1

	Mức độ tiêu thụ Xyloza (g/L·h)	Cân bằng cacbon %					
		Etanol	Cacbon dioxit*	Xylitol	Glyxerol	Sinh trưởng tế bào	Chỉ số khác
Chủng đối chứng	1,1	35,8	17,9	14,4	5,3	10,2	16,5
Chủng biểu hiện quá mức SOR1	1,1	36,8	18,4	13,3	5,0	11,8	14,9
Chủng biểu hiện quá mức GDH2	0,9	36,5	18,2	11,5	0,7	12,6	20,5

*Lượng Cacbon dioxit gắn liền với việc tạo ra etanol được thể hiện.

Ví dụ 2

1. Sự tạo vector để đưa vào trên nhiễm sắc thể

Vector pUC18 có sẵn trên thị trường được phân cắt bằng EcoRI và KpnI, và phần nửa trước của trình tự δ (1 đến 240 bp) nhân lên từ nhiễm sắc thể của nấm men (Nấm men rượu sakê số 7) được đưa vào đó. Vector thu được được phân cắt bằng PstI và SphI, và phần nửa sau của trình tự δ (241 đến 334 bp) cũng được nhân lên từ nấm men (Nấm men rượu sakê số 7) được đưa vào đó, nhờ đó thu được vector pUC- δ . pUC- δ được phân cắt bằng SmaI, và các đoạn gen GRE3-SOR1 và XKS1-SOR1 thu được bằng cách liên kết hai gen thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1 được đưa vào đó, nhờ đó lần lượt thu được vector pUC- δ -GRE3-SOR1 và vector pUC- δ -XKS1-SOR1. Các gen tương ứng, là GRE3, SOR1 và XKS1 thu được từ nấm men rượu sakê số 7.

2. Sự tạo ra nấm men mà có khả năng đồng hoá xyloza

Các vector pUC- δ -GRE3-SOR1 và pUC- δ -XKS1-SOR1 thu được trong phần 1 nêu trên được phân cắt bằng StuI để tạo ra các đoạn thẳng. Sau đó, các vector này được trộn lẫn với lượng bằng nhau và được đưa vào chủng nấm men

shochu S-2 theo phương pháp lithi axetat. Dịch nuôi cấy của nấm men mà trong đó các đoạn gen đã được đưa vào được áp dụng cho đĩa môi trường thạch xyloza SD chứa axit amin (xyloza 5%), và ủ ở 30°C trong 7 đến 10 ngày để thu được các chủng được biến nạp nhiễm sắc thể (các chủng A đến G). Các các chủng biến đổi gen được nuôi cấy trong môi trường lỏng chứa SC-X (xyloza 5%) (ống nuôi cấy 2 ml/15 ml, 140 vòng/phút, 30°C), và các chủng sinh trưởng tốt được đưa đi đánh giá bằng nuôi cấy.

Hơn nữa, GRE3-SOR1-XKS1 liên kết thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1 được đưa vào locus XYL2 để tạo ra nấm men có khả năng đồng hoá xyloza (chủng XYL2) làm chủng đối chứng. Chủng nấm men này (chủng XYL2) cũng được đưa đi đánh giá bằng nuôi cấy.

3. Đánh giá khả năng lên men

Các chủng tạo ra trong phần 2 nêu trên được nuôi cấy sơ bộ bằng YPD (chứa 2% glucoza) và sau đó được nuôi cấy xoay tròn trong bình nón 50 ml chứa 15 ml môi trường có thành phần được thể hiện trong Bảng 3

(lượng cấy ban đầu $OD_{600}=20$, 30°C, 140 vòng/phút), và việc lấy mẫu được thực hiện theo thời gian để đánh giá khả năng lên men. Sản phẩm chuyển hoá của quá trình lên men được định lượng bằng HPLC bằng cách sử dụng cột Shodex SUGAR SP0810. Nồng độ tế bào được đo bằng quang phổ kế.

Bảng 2: Thành phần môi trường (g/L)

Glucoza	80
Xyloza	50
Amoni sulfat	7,5
Mononatri hydrogen phosphate	3,5
Kali hydro phtalat	10,2
Magiê sulfat heptahydrat	0,8

4. Các kết quả đánh giá khả năng lên men

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3. Các chủng biến đổi gen gen A đến G tạo ra bằng kỹ thuật nêu trên chứng tỏ hiệu suất tạo etanol cao. Lượng etanol sản xuất của mỗi các chủng biến đổi gen A đến G được cải thiện so với nấm men có khả năng đồng hoá xyloza này (chủng XYL2) tạo ra bằng cách đưa

GRE3-SOR1-XKS1 vào locus XYL2 ở dạng đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1.

Bảng 3: So sánh hiệu suất tạo etanol (%)

Chủng đối chứng	Các chủng biến đổi gen A	Các chủng biến đổi gen B	Các chủng biến đổi gen C	Các chủng biến đổi gen D	Các chủng biến đổi gen E	Các chủng biến đổi gen F	Các chủng biến đổi gen G
74,2	77,5	77,1	77,6	77,7	79,7	78,7	79,4

Ví dụ 3

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng nấm men rượu sakê số 7 theo cách tương tự như trong Ví dụ 2.

Bằng cách sử dụng GRE3, SOR1 và XKS1 thu được từ nấm men rượu sakê số 7, vector pUC- δ -GRE3-SOR1 và vector pUC- δ -XKS1-SOR1 thu được theo cách tương tự như trong phần 1 của Ví dụ 2. Bằng cách sử dụng các vector pUC- δ -GRE3-SOR1 và pUC- δ -XKS1-SOR1 thu được và nấm men (Nấm men rượu sakê số 7), nấm men có khả năng đồng hoá xyloza được tạo ra theo cách tương tự như trong phần 2 của Ví dụ 2 (các các chủng biến đổi gen gen H đến M).

Các chủng biến đổi gen H đến M được đưa đi đánh giá khả năng lên men theo cách tương tự như trong phần 3 của Ví dụ 2. Chủng biểu hiện quá mức SOR1 (nấm men rượu sakê số 7) tạo ra theo cách tương tự như trong Ví dụ 1 và chủng XYL2 (nấm men rượu sakê số 7) tạo ra bằng cách đưa GRE3-SOR1-XKS1 liên kết thành đoạn nối tiếp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu PGK1 vào locus XYL2 làm chủng đối chứng được đưa đi đánh giá khả năng lên men.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4. Chủng biểu hiện quá mức SOR1 và các chủng biến đổi gen H đến M chứng tỏ hiệu suất tạo etanol cao so với chủng đối chứng. Cụ thể, các chủng biến đổi gen H đến M chứng tỏ sự cải thiện tốt hơn về lượng etanol tạo ra.

Bảng 4: So sánh hiệu suất tạo etanol (%)

Chủng đổi chúng	Chủng biểu hiện quá mức SOR1	Chủng biến đổi gen H	Chủng biến đổi gen I	Chủng biến đổi gen J	Chủng biến đổi gen K	Chủng biến đổi gen L	Chủng biến đổi gen M
67,3	68,9	67,7	68,9	69,3	69,3	69,3	68,3

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo sáng chế này, nấm men biến đổi gen có khả năng sản xuất etanol từ xyloza được tạo ra.

Theo một phương án thực hiện của sáng chế này, sự biến đổi của nấm men được thực hiện bằng cách sử dụng các gen có trong chính nấm men, và do đó nấm men biến đổi gen theo sáng chế này không thuộc loại gen tái tổ hợp, và theo đó nó được ưu tiên nhờ các đặc điểm an toàn và dễ xử lý.

Hơn nữa, nấm men biến đổi gen theo sáng chế này có khả năng sản xuất etanol từ xyloza rất tốt, và do đó, khi sử dụng nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, etanol có thể được sản xuất từ xyloza một cách hữu hiệu.

Hơn nữa, do nhận thấy nấm men biến đổi gen theo sáng chế này giảm lượng sản phẩm phụ tạo ra như xylitol và glyxerol, nên khi etanol được sản xuất bằng cách sử dụng nấm men biến đổi gen theo sáng chế này, có thể tránh được vấn đề tích tụ các sản phẩm phụ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Nấm men biến đổi gen có ba gen là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào theo chức năng trên nhiễm sắc thể của nó, trong đó nấm men này có khả năng sản xuất ethanol từ xyloza, trong đó ba gen này được xen vào trên nhiễm sắc thể ở dạng gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xyloza reductaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và ở dạng gen thu được bằng cách liên kết gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, và trong đó gen mã hoá xylitol dehydrogenaza là gen được chọn từ nhóm bao gồm SOR1 và SOR2.
2. Nấm men theo điểm 1, trong đó các gen này là các gen nội sinh của nấm men.
3. Nấm men theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gen mã hoá xyloza reductaza là gen được chọn từ nhóm bao gồm GRE3, YJR096w, YPR1, GCY1, ARA1 và YDR124w.
4. Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza lần lượt là GRE3, SOR1 và XKS1.
5. Nấm men biến đổi gen được tạo ra bằng cách đưa vào theo chức năng ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza vào vật chủ nấm men có ba gen là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào theo chức năng trên nhiễm sắc thể của nó, trong đó gen mã hoá xylitol dehydrogenaza là gen được chọn từ nhóm bao gồm SOR1 và SOR2, và trong đó nấm men này có khả năng sản xuất ethanol từ xyloza.
6. Nấm men theo điểm 5, trong đó các gen này thu được từ vật chủ nấm men.
7. Nấm men theo điểm 5 hoặc 6, trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được xen vào theo chức năng trên nhiễm sắc thể của vật chủ nấm men.
8. Nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, mà được tạo ra bằng cách đưa vào theo chức năng ít nhất một gen được chọn từ GDH2 và SOR1 vào vật chủ nấm men có ba gen là GRE3, SOR1 và XKS1,

được xen vào trên nhiễm sắc thể của nó.

9. Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó nấm men có ba gen là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào là nấm men thuộc loài *Saccharomyces*.

10. Nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó nấm men có ba gen là gen mã hoá xyloza reductaza, gen mã hoá xylitol dehydrogenaza và gen mã hoá xyluloza kinaza, được xen vào là *Saccharomyces cerevisiae*.

11. Phương pháp sản xuất etanol, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 trong môi trường chứa xyloza để thu etanol từ môi trường nuôi cấy thu được.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được đưa vào nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10 là gen mã hoá glutamat dehydrogenaza hoặc cả gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó ít nhất một gen được chọn từ gen mã hoá glutamat dehydrogenaza và gen mã hoá xylitol dehydrogenaza được đưa vào nấm men biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10 là gen mã hoá xylitol dehydrogenaza, và trong đó bước nuôi cấy được thực hiện với sự có mặt của NAD⁺.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JX NIPPON OIL & ENERGY CORPORATION

<120> Nấm men biến đổi gen có khả năng sản xuất etanol từ xyloza và phương pháp sản xuất etanol

<130> G1309

<140> PCT/JP2013/077674

<141> 2013-10-10

<150> JP 2012-225391

<151> 2012-10-10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 984

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

atgtcttcac tggttactct taataacggt ctgaaaatgc ccctagtcgg cttagggtgc	60
tggaaaattg acaaaaaagt ctgtgcgaat caaatattatg aagctatcaa attaggctac	120
cgtttattog atgggtccttgc cgactacggc aacgaaaagg aagttggtga aggtatcagg	180
aaagccatct ccgaaggtct tgtttctaga aaggatataat ttgttgtttc aaagttatgg	240
aacaattttc accatcctga tcatgtaaaa ttagctttta agaagacctt aagcgatatg	300
ggacttgatt atttagacct gtattatatt cacttcccaa tcgccttcaa atatgttcca	360
tttgaagaga aataccctcc aggtattctat acgggcgagc atgacgagaa gaaaggctac	420
atcaccgaag cacatgtacc aatcatagat acgtaccggg ctctggaaga atgtgttgat	480
gaaggcttga ttaagtctat tgggtgtttc aactttcagg gaagcttgat tcaagattta	540
ttacgtgggt gtagaatcaa gcccggtggc ttgcaaattg aacaccatcc ttatttgact	600
caagaacacc tagttgagtt ttgtaaatta cagcatatcc aagtagttgc ttactcctcc	660
ttcggctcctc aatcattcat tgagatggac ttacagttgg caaaaaccac gccaaactctg	720
ttcgagaatg atgtaataca gaaggcttca caaaaccatc caggcagtag cacttcccaa	780
gtattgctta gatgggcaac tcagagaggc attgccgtca ttccaaaatc ttccaagaag	840
gaaaggttac ttggcaacct agaaatcgaa aaaaagttca ctttaacgga gcaagaattg	900
aaggatattt ctgcactaaa tgccaacatc agatttaatg atccatggac ctggttgat	960
ggtaaattcc ccacttttgc ctga	984

<210> 2

<211> 327

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Ser Ser Leu Val Thr Leu Asn Asn Gly Leu Lys Met Pro Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Cys Trp Lys Ile Asp Lys Lys Val Cys Ala Asn Gln Ile
 20 25 30

Tyr Glu Ala Ile Lys Leu Gly Tyr Arg Leu Phe Asp Gly Ala Cys Asp
 35 40 45

Tyr Gly Asn Glu Lys Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg Lys Ala Ile Ser
 50 55 60

Glu Gly Leu Val Ser Arg Lys Asp Ile Phe Val Val Ser Lys Leu Trp
 65 70 75 80

Asn Asn Phe His His Pro Asp His Val Lys Leu Ala Leu Lys Lys Thr
 85 90 95

Leu Ser Asp Met Gly Leu Asp Tyr Leu Asp Leu Tyr Tyr Ile His Phe
 100 105 110

Pro Ile Ala Phe Lys Tyr Val Pro Phe Glu Glu Lys Tyr Pro Pro Gly
 115 120 125

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

His Val Pro Ile Ile Asp Thr Tyr Arg Ala Leu Glu Glu Cys Val Asp
 145 150 155 160

Glu Gly Leu Ile Lys Ser Ile Gly Val Ser Asn Phe Gln Gly Ser Leu
 165 170 175

Ile Gln Asp Leu Leu Arg Gly Cys Arg Ile Lys Pro Val Ala Leu Gln
 180 185 190

Ile Glu His His Pro Tyr Leu Thr Gln Glu His Leu Val Glu Phe Cys
 195 200 205

Lys Leu His Asp Ile Gln Val Val Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Pro Gln
 210 215 220

Ser Phe Ile Glu Met Asp Leu Gln Leu Ala Lys Thr Thr Pro Thr Leu
 225 230 235 240

Phe Glu Asn Asp Val Ile Lys Lys Val Ser Gln Asn His Pro Gly Ser
 245 250 255

Thr Thr Ser Gln Val Leu Leu Arg Trp Ala Thr Gln Arg Gly Ile Ala
260 265 270

Val Ile Pro Lys Ser Ser Lys Lys Glu Arg Leu Leu Gly Asn Leu Glu
275 280 285

Ile Glu Lys Lys Phe Thr Leu Thr Glu Gln Glu Leu Lys Asp Ile Ser
290 295 300

Ala Leu Asn Ala Asn Ile Arg Phe Asn Asp Pro Trp Thr Trp Leu Asp
305 310 315 320

Gly Lys Phe Pro Thr Phe Ala
325

<210> 3
<211> 1074
<212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3
atgtctcaaa atagtaaccc tgcagtagtt ctagagaaag tcggcgatat tgccatcgag 60
caaagaccaa tccctaccat taaggacccc cattatgtca agttagctat taaagccact 120
ggtatctgcg gctctgatat tcattattat agaagcgggtg gtattggtaa gtacatattg 180
aaggcgocaa tggttttagg tcatgaatca agcggacagg ttgtggaagt tggatgatgcc 240
gtcacaaggg tcaaagttgg tgaccgtgtt gctattgaac ctggtgttcc tagccgttac 300
tctgatgaga ccaaagaagg gaggtataac ctttggccac atatggcatt tgctgcaact 360
cctccaattg atggtactct tgtgaagtac tatttatctc cagaagattt ctttgtgaaa 420
ttgccagaag gcgtcagtta tgaagagggc gcttgtgtcg aacccttacc agtcggtgta 480
cactctaata aattggctgg ggtccgcttt ggtaccaaag ttgttgtatt tggatgcagg 540
cctgtggggc ttttaactgg cgcagtcgcc cgcgcttttg gtgccaccga cgtcattttc 600
gtcgtatgat tcgacaacaa gctacagaga gcaaaagatt tcggagccac aaacactttc 660
aattcttccc agttttccac cgataaagcc caagacttgg ccgatggggc ccaaaagctt 720
ttgggcggaa atcacgcaga tgtggtgttt gagtgttcag gtgctgatgt ttgcattgat 780
gccgtgtca aaacaactaa ggttgagggt accatgggtc aagtcgggtat gggtaaaaac 840
tacactaatt ttccaattgc tgaagttagt ggaaaggaaa tgaaattgat tggatgtttc 900
cgttattcat tcggtgatta tcgtgacgct gtgaacttgg ttgccacagg aaaagtcaat 960
gtcaagccat tgataaccca caaatTTAAA tttgaagatg cagccaaggc ttacgactac 1020
aacattgccc atggtggaga ggtagtcaag actattatct ttggtcctga atga 1074

<210> 4

<211> 357
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

Met Ser Gln Asn Ser Asn Pro Ala Val Val Leu Glu Lys Val Gly Asp
 1 5 10 15

Ile Ala Ile Glu Gln Arg Pro Ile Pro Thr Ile Lys Asp Pro His Tyr
 20 25 30

Val Lys Leu Ala Ile Lys Ala Thr Gly Ile Cys Gly Ser Asp Ile His
 35 40 45

Tyr Tyr Arg Ser Gly Gly Ile Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Ala Pro Met
 50 55 60

Val Leu Gly His Glu Ser Ser Gly Gln Val Val Glu Val Gly Asp Ala
 65 70 75 80

Val Thr Arg Val Lys Val Gly Asp Arg Val Ala Ile Glu Pro Gly Val
 85 90 95

Pro Ser Arg Tyr Ser Asp Glu Thr Lys Glu Gly Arg Tyr Asn Leu Cys
 100 105 110

Pro His Met Ala Phe Ala Ala Thr Pro Pro Ile Asp Gly Thr Leu Val
 115 120 125

Lys Tyr Tyr Leu Ser Pro Glu Asp Phe Leu Val Lys Leu Pro Glu Gly
 130 135 140

Val Ser Tyr Glu Glu Gly Ala Cys Val Glu Pro Leu Ser Val Gly Val
 145 150 155 160

His Ser Asn Lys Leu Ala Gly Val Arg Phe Gly Thr Lys Val Val Val
 165 170 175

Phe Gly Ala Gly Pro Val Gly Leu Leu Thr Gly Ala Val Ala Arg Ala
 180 185 190

Phe Gly Ala Thr Asp Val Ile Phe Val Asp Val Phe Asp Asn Lys Leu
 195 200 205

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Gly Ala Thr Asn Thr Phe Asn Ser Ser Gln
 210 215 220

Phe Ser Thr Asp Lys Ala Gln Asp Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Asn His Ala Asp Val Val Phe Glu Cys Ser Gly Ala Asp
245 250 255

Val Cys Ile Asp Ala Ala Val Lys Thr Thr Lys Val Gly Gly Thr Met
260 265 270

Val Gln Val Gly Met Gly Lys Asn Tyr Thr Asn Phe Pro Ile Ala Glu
275 280 285

Val Ser Gly Lys Glu Met Lys Leu Ile Gly Cys Phe Arg Tyr Ser Phe
290 295 300

Gly Asp Tyr Arg Asp Ala Val Asn Leu Val Ala Thr Gly Lys Val Asn
305 310 315 320

Val Lys Pro Leu Ile Thr His Lys Phe Lys Phe Glu Asp Ala Ala Lys
325 330 335

Ala Tyr Asp Tyr Asn Ile Ala His Gly Gly Glu Val Val Lys Thr Ile
340 345 350

Ile Phe Gly Pro Glu
355

<210> 5
<211> 1803
<212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5
atgttgtgtt cagtaattca gagacagaca agagaggttt ccaacacaat gtcttttagac 60
tcatactatc ttgggtttga tctttcgacc caacaactga aatgtotcgc cattaaccag 120
gacctaaaaa ttgtccattc agaaacagtg gaatttgaaa aggatottcc gcattatcac 180
acaaagaagg gtgtctatat acacggcgac actatcgaat gtcccgtagc catgtggtta 240
gaggctotag atctggttct ctcgaaatat cgcgaggcta aatttccatt gaacaaagtt 300
atggcgtctc cagggtcctg ccagcagcac gggctctgtct actggtcctc ccaagccgaa 360
tctctgtag agcaattgaa taagaaaccg gaaaaagatt tattgcacta cgtgagctct 420
gtagcatttg caaggcaaac cgccccaat tggcaagacc acagtactgc aaagcaatgt 480
caagagtttg aagagtgcac aggtgggcct gaaaaaatgg ctcaattaac aggggtccaga 540
gccatttta gatttactgg tctcaaat ctgaaaattg cacaattaga accagaagct 600
tacgaaaaaa caaagaccat ttctttagtg totaattttt tgacttctat cttagtgggc 660
catcttggtg aattagagga ggcagatgcc tgtggtatga acctttatga tatacgtgaa 720
agaaaattca gtgatgagct actacatcta attgatagtt cttctaagga taaaactatc 780

```

agacaaaaat taatgagagc acccatgaaa aatttgatag cgggtaccat ctgtaaatat      840
tttattgaga agtacgggtt caatacaaac tgcaaggtct ctcccatgac tggggataat      900
ttagccacta tatgttcttt acccctgcgg aagaatgacg ttctcgttct cctaggaaca      960
agtactacag ttcttctggt caccgataag taccaccctt ctccgaacta tcattctttt    1020
attcatccaa ctctgccaaa ccattatatg ggtatgattt gttattgtaa tggttctttg    1080
gcaagggaga ggataagaga cgagttaaac aaagaacggg aaaataatta tgagaagact    1140
aacgattgga ctctttttta tcaagctgtg ctagatgact cagaaagtag tgaaaatgaa    1200
ttaggtgtat attttctctt gggggagatc gttcctagcg taaaagccat aaacaaaagg    1260
gttatcttca atocaaaaac ggggtatgatt gaaagagagg tggccaagtt caaagacaag    1320
aggcacgatg ccaaaaatat tgtagaatca caggctttta gttgcagggt aagaatatct    1380
cccctgcttt cggattcaaa cgcaagctca caacagagac tgaacgaaga tacaatcgtg    1440
aagtttgatt acgatgaatc tccgctgcgg gactacctaa ataaaaggcc agaaaggact    1500
ttttttgtag gtggggcttc taaaaacgat gctattgtga agaagtttgc tcaagtcatt    1560
ggtgctacaa agggtaattt taggctagaa acaccaaact catgtgccct tgggtggtgt    1620
tataaggcca tgtggtcatt gttatatgac tctaataaaa ttgcagttcc ttttgataaa    1680
tttctgaatg acaattttcc atggcatgta atggaaagca tatccgatgt ggataatgaa    1740
aattgggatc gctataattc caagattgtc cccttaagcg aactggaaaa gactctcatc    1800
taa                                                                    1803

```

<210> 6
 <211> 600
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

Met Leu Cys Ser Val Ile Gln Arg Gln Thr Arg Glu Val Ser Asn Thr
 1 5 10 15

Met Ser Leu Asp Ser Tyr Tyr Leu Gly Phe Asp Leu Ser Thr Gln Gln
 20 25 30

Leu Lys Cys Leu Ala Ile Asn Gln Asp Leu Lys Ile Val His Ser Glu
 35 40 45

Thr Val Glu Phe Glu Lys Asp Leu Pro His Tyr His Thr Lys Lys Gly
 50 55 60

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

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

Leu Asn Lys Val Met Ala Val Ser Gly Ser Cys Gln Gln His Gly Ser
100 105 110

Val Tyr Trp Ser Ser Gln Ala Glu Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Lys
115 120 125

Lys Pro Glu Lys Asp Leu Leu His Tyr Val Ser Ser Val Ala Phe Ala
130 135 140

Arg Gln Thr Ala Pro Asn Trp Gln Asp His Ser Thr Ala Lys Gln Cys
145 150 155 160

Gln Glu Phe Glu Glu Cys Ile Gly Gly Pro Glu Lys Met Ala Gln Leu
165 170 175

Thr Gly Ser Arg Ala His Phe Arg Phe Thr Gly Pro Gln Ile Leu Lys
180 185 190

Ile Ala Gln Leu Glu Pro Glu Ala Tyr Glu Lys Thr Lys Thr Ile Ser
195 200 205

Leu Val Ser Asn Phe Leu Thr Ser Ile Leu Val Gly His Leu Val Glu
210 215 220

Leu Glu Glu Ala Asp Ala Cys Gly Met Asn Leu Tyr Asp Ile Arg Glu
225 230 235 240

Arg Lys Phe Ser Asp Glu Leu Leu His Leu Ile Asp Ser Ser Ser Lys
245 250 255

Asp Lys Thr Ile Arg Gln Lys Leu Met Arg Ala Pro Met Lys Asn Leu
260 265 270

Ile Ala Gly Thr Ile Cys Lys Tyr Phe Ile Glu Lys Tyr Gly Phe Asn
275 280 285

Thr Asn Cys Lys Val Ser Pro Met Thr Gly Asp Asn Leu Ala Thr Ile
290 295 300

Cys Ser Leu Pro Leu Arg Lys Asn Asp Val Leu Val Ser Leu Gly Thr
305 310 315 320

Ser Thr Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Lys Tyr His Pro Ser Pro Asn
325 330 335

Tyr His Leu Phe Ile His Pro Thr Leu Pro Asn His Tyr Met Gly Met
340 345 350

Ile Cys Tyr Cys Asn Gly Ser Leu Ala Arg Glu Arg Ile Arg Asp Glu
 355 360 365

Leu Asn Lys Glu Arg Glu Asn Asn Tyr Glu Lys Thr Asn Asp Trp Thr
 370 375 380

Leu Phe Asn Gln Ala Val Leu Asp Asp Ser Glu Ser Ser Glu Asn Glu
 385 390 395 400

Leu Gly Val Tyr Phe Pro Leu Gly Glu Ile Val Pro Ser Val Lys Ala
 405 410 415

Ile Asn Lys Arg Val Ile Phe Asn Pro Lys Thr Gly Met Ile Glu Arg
 420 425 430

Glu Val Ala Lys Phe Lys Asp Lys Arg His Asp Ala Lys Asn Ile Val
 435 440 445

Glu Ser Gln Ala Leu Ser Cys Arg Val Arg Ile Ser Pro Leu Leu Ser
 450 455 460

Asp Ser Asn Ala Ser Ser Gln Gln Arg Leu Asn Glu Asp Thr Ile Val
 465 470 475 480

Lys Phe Asp Tyr Asp Glu Ser Pro Leu Arg Asp Tyr Leu Asn Lys Arg
 485 490 495

Pro Glu Arg Thr Phe Phe Val Gly Gly Ala Ser Lys Asn Asp Ala Ile
 500 505 510

Val Lys Lys Phe Ala Gln Val Ile Gly Ala Thr Lys Gly Asn Phe Arg
 515 520 525

Leu Glu Thr Pro Asn Ser Cys Ala Leu Gly Gly Cys Tyr Lys Ala Met
 530 535 540

Trp Ser Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Lys Ile Ala Val Pro Phe Asp Lys
 545 550 555 560

Phe Leu Asn Asp Asn Phe Pro Trp His Val Met Glu Ser Ile Ser Asp
 565 570 575

Val Asp Asn Glu Asn Trp Asp Arg Tyr Asn Ser Lys Ile Val Pro Leu
 580 585 590

Ser Glu Leu Glu Lys Thr Leu Ile
 595 600

<210> 7
 <211> 3279
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7
 atgctttttg ataacaaaaa tcgcggtgct ttaaactcac tgaacacacc agatattgct 60
 tctttatcaa tatcatccat gtcggactat cacgtgttg attttcccg taaggacctg 120
 cagagagagg aagtgataga ttgctagat cagcaagggt ttattccga cgatttgatc 180
 gaacaagaag tagattgggt ttataactca ttgggtattg acgatttggt cttctcgaga 240
 gaatctcccc aattaatctc gaatatcata cattctttgt atgcttcaa gctagatttc 300
 tttcggaagt ccaaattcaa oggaattcag ccaaggctat tcagcattaa aaacaaaatt 360
 ataactaatg ataatcatgc catctttatg gaatctaata ctgggtgcag cataagcgat 420
 tctcagcaaa aaaactttta atttgctagt gacgcgctcg gaaacgatac tttggagcat 480
 ggtaaggata ccatcaaaaa aaataggatt gaaatggatg attcttgtcc accttatgaa 540
 ttagattccg aaattgatga ccttttctcg gataacaagt ctcaaaaaaa ctgcagatta 600
 gtttcttttt gggctccaga aagcgaatta aagctaactt ttgtttatga gagtgtttac 660
 cctaattgatg atccagccgg cgtagatatt tcctctcagg atttgctgaa aggtgatatt 720
 gaatcgatta gtgataagac catgtacaaa gtttctgoga acgaaaataa aaaactatac 780
 ggtctcttac ttaagttggt taaagaaaga gaaggctctg tcattaagac tactcgctcc 840
 gtagaaaata aggatgaaat taggttatta gtcgcttaca agcgattcac cactaagcgt 900
 tattactctg ctttgaactc ttgtttccac tattacaagt tgaaaccttc taagttctat 960
 ttagagtcgt ttaatgttaa ggatgatgac atcattatct tttccgttta ttgaaacgag 1020
 aaccagcaat tggaagatgt tctacttcac gatgtggagg cagcattgaa acaggttgaa 1080
 agagaagctt cattgctata cgctatccca aacaattctt tccatgaggt ttaccagaga 1140
 cgtcaattct cgcccaaaga agctatatat gctcatattg gtgctatatt cattaacct 1200
 tttgttaatc gtttaggctc tgattatcaa aaccttttat ctcaaatcac cattaagcgt 1260
 aatgatacta ctcttttgga gattgtagaa aacctaaaaa gaaagttaag aaatgaaacc 1320
 ttaactcagc aaactattat caacatcatg togaagcatt acactataat ttccaagttg 1380
 tataaaaaatt ttgtcaaat tcaactattat cataatagta ctaaagatat ggagaagaca 1440
 ttatcttttc aaagactgga aaaagtggag ccttttaaga atgaccaaga gttogaagct 1500
 tacttgaata aattcattcc aaatgattca cctgatttgt tgatcctgaa aacactgaac 1560
 atcttcaaca agtctatttt gaagacaaat ttctttatta caagaaaagt agcaatatca 1620
 ttcagattag atccttcctt ggtgatgaca aaattcgaat atccagagac accctatggt 1680
 atatTTTTTg tcgttggtaa tactttcaaa gggttccata tcaggttcag agatatcgca 1740

```

aggggcggta ttcttatagt ctgttccagg aatcaggata tttatgattt gaattccaag 1800
aacgttattg atgagaacta tcaattggcc tctactcagc aacgtaaaaa taaggatatt 1860
ccagagggtg gctctaaagg tgtcatctta ttgaaccag gattggtaga acatgaccag 1920
acatttgtcg ccttttccca atatgtggat gcaatgattg acatttctaat caacgatcca 1980
ttaaaggaaa actatgtcaa ccttttacca aaggaggaaa tattatTTTT tggcccagat 2040
gaaggaactg ctggtttcgt ggattgggca actaaccatg ctogtgtgag gaactgcca 2100
tggtggaaat catTTTTgac tggaaaatcc ccattcttgg gtggtattcc ccatgacgaa 2160
tatggtatga cttctctggg tgttctgtgt tatgttaata aaatttacga aactttaaac 2220
ttgacaaatt ctactgttta caaattccaa actggtggtc cggatggtga tttgggatcc 2280
aatgaaattc ttttatcttc gccaaacgaa tgttatttgg caattctgga cggttcaggt 2340
gtcctgtgtg atcctaaagg tttagataaa gatgaattat gccgcttggc acatgaaagg 2400
aaaaatgattt ccgatttcga cacttccaaa ttatcaaaca acggattttt tgtttctgtg 2460
gatgcaatgg atatcatgct accaaatggg acaattgtag ctaacggcac aaccttcaga 2520
aacacctttc ataactcaat tttcaaattt gtggatcatg tcgacatttt tgttccatgc 2580
ggtggtagac caaactcaat tactctaaat aatctacatt atttgttga cgaaaagact 2640
gggaaatgta aaattccata tattgtggag ggtgccaatc tatttataac gcaacctgct 2700
aaaaatgctt tggaggaaca tggctgtatt ctgttcaaag atgcttctgc aaacaaagg 2760
ggtgtcacat cttcatcaat ggaagtgtt gacctactag cgcttaacga taacgacttc 2820
gtgcacaaat ttattggaga tgttagtggg gagaggcttg cgttgtaaa gtogtacgtt 2880
gtagaagtgc agtcaagaat tcagaaaaat gctgaattag agtttgggtc gttatggaat 2940
ttgaatcaac taaatggaac ccacatttca gaaatttcaa accaattgtc cttoactata 3000
aacaattga acgacgatct agttgcttct caagagttgt ggctcaatga totaaaatta 3060
agaaactacc tattgttga taaaataatt ccaaaaattc tgattgatgt tgotgggcct 3120
cagtccgtat tggaaaacat tccagagagc ttttgaaag ttcttctgtc gagttactta 3180
tcaagcattt ttgtttacca gaacggtatc gatgttaaca ttggaaaatt cttggaattt 3240
attggtgggt taaaaagaga agcggaggca agtgcttga 3279

```

<210> 8
 <211> 1092
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

Met Leu Phe Asp Asn Lys Asn Arg Gly Ala Leu Asn Ser Leu Asn Thr
 1 5 10 15

Pro Asp Ile Ala Ser Leu Ser Ile Ser Ser Met Ser Asp Tyr His Val

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

Leu Leu Val Ala Tyr Lys Arg Phe Thr Thr Lys Arg Tyr Tyr Ser Ala
 290 295 300

Leu Asn Ser Leu Phe His Tyr Tyr Lys Leu Lys Pro Ser Lys Phe Tyr
 305 310 315 320

Leu Glu Ser Phe Asn Val Lys Asp Asp Asp Ile Ile Ile Phe Ser Val
 325 330 335

Tyr Leu Asn Glu Asn Gln Gln Leu Glu Asp Val Leu Leu His Asp Val
 340 345 350

Glu Ala Ala Leu Lys Gln Val Glu Arg Glu Ala Ser Leu Leu Tyr Ala
 355 360 365

Ile Pro Asn Asn Ser Phe His Glu Val Tyr Gln Arg Arg Gln Phe Ser
 370 375 380

Pro Lys Glu Ala Ile Tyr Ala His Ile Gly Ala Ile Phe Ile Asn His
 385 390 395 400

Phe Val Asn Arg Leu Gly Ser Asp Tyr Gln Asn Leu Leu Ser Gln Ile
 405 410 415

Thr Ile Lys Arg Asn Asp Thr Thr Leu Leu Glu Ile Val Glu Asn Leu
 420 425 430

Lys Arg Lys Leu Arg Asn Glu Thr Leu Thr Gln Gln Thr Ile Ile Asn
 435 440 445

Ile Met Ser Lys His Tyr Thr Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Lys Asn Phe
 450 455 460

Ala Gln Ile His Tyr Tyr His Asn Ser Thr Lys Asp Met Glu Lys Thr
 465 470 475 480

Leu Ser Phe Gln Arg Leu Glu Lys Val Glu Pro Phe Lys Asn Asp Gln
 485 490 495

Glu Phe Glu Ala Tyr Leu Asn Lys Phe Ile Pro Asn Asp Ser Pro Asp
 500 505 510

Leu Leu Ile Leu Lys Thr Leu Asn Ile Phe Asn Lys Ser Ile Leu Lys
 515 520 525

Thr Asn Phe Phe Ile Thr Arg Lys Val Ala Ile Ser Phe Arg Leu Asp
 530 535 540

Pro Ser Leu Val Met Thr Lys Phe Glu Tyr Pro Glu Thr Pro Tyr Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Phe Val Val Gly Asn Thr Phe Lys Gly Phe His Ile Arg Phe
 565 570 575
 Arg Asp Ile Ala Arg Gly Gly Ile Arg Ile Val Cys Ser Arg Asn Gln
 580 585 590
 Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Ser Lys Asn Val Ile Asp Glu Asn Tyr Gln
 595 600 605
 Leu Ala Ser Thr Gln Gln Arg Lys Asn Lys Asp Ile Pro Glu Gly Gly
 610 615 620
 Ser Lys Gly Val Ile Leu Leu Asn Pro Gly Leu Val Glu His Asp Gln
 625 630 635 640
 Thr Phe Val Ala Phe Ser Gln Tyr Val Asp Ala Met Ile Asp Ile Leu
 645 650 655
 Ile Asn Asp Pro Leu Lys Glu Asn Tyr Val Asn Leu Leu Pro Lys Glu
 660 665 670
 Glu Ile Leu Phe Phe Gly Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Phe Val Asp
 675 680 685
 Trp Ala Thr Asn His Ala Arg Val Arg Asn Cys Pro Trp Trp Lys Ser
 690 695 700
 Phe Leu Thr Gly Lys Ser Pro Ser Leu Gly Gly Ile Pro His Asp Glu
 705 710 715 720
 Tyr Gly Met Thr Ser Leu Gly Val Arg Ala Tyr Val Asn Lys Ile Tyr
 725 730 735
 Glu Thr Leu Asn Leu Thr Asn Ser Thr Val Tyr Lys Phe Gln Thr Gly
 740 745 750
 Gly Pro Asp Gly Asp Leu Gly Ser Asn Glu Ile Leu Leu Ser Ser Pro
 755 760 765
 Asn Glu Cys Tyr Leu Ala Ile Leu Asp Gly Ser Gly Val Leu Cys Asp
 770 775 780
 Pro Lys Gly Leu Asp Lys Asp Glu Leu Cys Arg Leu Ala His Glu Arg
 785 790 795 800

Lys Met Ile Ser Asp Phe Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asn Asn Gly Phe
 805 810 815

Phe Val Ser Val Asp Ala Met Asp Ile Met Leu Pro Asn Gly Thr Ile
 820 825 830

Val Ala Asn Gly Thr Thr Phe Arg Asn Thr Phe His Thr Gln Ile Phe
 835 840 845

Lys Phe Val Asp His Val Asp Ile Phe Val Pro Cys Gly Gly Arg Pro
 850 855 860

Asn Ser Ile Thr Leu Asn Asn Leu His Tyr Phe Val Asp Glu Lys Thr
 865 870 875 880

Gly Lys Cys Lys Ile Pro Tyr Ile Val Glu Gly Ala Asn Leu Phe Ile
 885 890 895

Thr Gln Pro Ala Lys Asn Ala Leu Glu Glu His Gly Cys Ile Leu Phe
 900 905 910

Lys Asp Ala Ser Ala Asn Lys Gly Gly Val Thr Ser Ser Ser Met Glu
 915 920 925

Val Leu Ala Ser Leu Ala Leu Asn Asp Asn Asp Phe Val His Lys Phe
 930 935 940

Ile Gly Asp Val Ser Gly Glu Arg Ser Ala Leu Tyr Lys Ser Tyr Val
 945 950 955 960

Val Glu Val Gln Ser Arg Ile Gln Lys Asn Ala Glu Leu Glu Phe Gly
 965 970 975

Gln Leu Trp Asn Leu Asn Gln Leu Asn Gly Thr His Ile Ser Glu Ile
 980 985 990

Ser Asn Gln Leu Ser Phe Thr Ile Asn Lys Leu Asn Asp Asp Leu Val
 995 1000 1005

Ala Ser Gln Glu Leu Trp Leu Asn Asp Leu Lys Leu Arg Asn Tyr
 1010 1015 1020

Leu Leu Leu Asp Lys Ile Ile Pro Lys Ile Leu Ile Asp Val Ala
 1025 1030 1035

Gly Pro Gln Ser Val Leu Glu Asn Ile Pro Glu Ser Tyr Leu Lys
 1040 1045 1050

Val Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Ser Ser Thr Phe Val Tyr Gln Asn

30157

1055

1060

1065

Gly Ile Asp Val Asn Ile Gly Lys Phe Leu Glu Phe Ile Gly Gly
1070 1075 1080

Leu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ala
1085 1090