



(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)



1-0031471

(51)<sup>7</sup> A23F 5/24; C12N 9/24

(13) B

(21) 1-2018-00382

(22) 24/06/2016

(86) PCT/EP2016/064727 24/06/2016

(87) WO2016/207384 29/12/2016

(30) 15174117.0 26/06/2015 EP; 15174110.5 26/06/2015 EP

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/05/2018 362A

(73) Novozymes A/S (DK)

Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, Denmark

(72) EKLÖF, Jens, Magnus (SE); RASMUSSEN, Louise (DK); LYNGLÉV, Gitte, Budolfsen (DK); SPODSBERG, Nikolaj (DK); KROGH, Kristian, Bertel, Roemer, M (DK).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHIẾT XUẤT CÀ PHÊ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê mà bao gồm việc sử dụng enzym có hoạt tính mananaza. Sáng chế còn đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza và polynucleotit mã hóa polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến cấu trúc axit nucleic, vector, và tế bào chủ bao gồm polynucleotit cũng như phương pháp sản xuất và sử dụng polypeptit.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến việc sản xuất chiết xuất cà phê được hỗ trợ bởi enzym. Sáng chế còn đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza và polynucleotit mã hóa polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến cấu trúc axit nucleic, vector, và tế bào chủ bao gồm polynucleotit cũng như phương pháp sản xuất và sử dụng polypeptit.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Chiết xuất cà phê, tức là, dung dịch nước của chất rắn tan được chiết xuất từ hạt cà phê, có nhiều ứng dụng công nghiệp khác nhau. Nó được sử dụng, ví dụ, trong sản xuất cà phê uống liền; sản phẩm cà phê dùng ngay như đồ uống cà phê đóng hộp và cà phê đóng chai; và các ứng dụng không phải đồ uống như đồ tráng miệng dùng liền, sản phẩm và hương vị bánh kẹo.

Chiết xuất cà phê thương mại thường được tạo ra bằng cách xử lý nhiệt từng giai đoạn, kết hợp của các giai đoạn làm ướt, chiết và thủy phân, mà hòa tan phần trăm cao chất rắn cà phê rang và xay. Nhiệt độ rất cao cần để tác động đến sự thủy phân nhiệt và điều này có thể dẫn đến mất mùi và xử lý mất nhiều chi phí và vốn.

Việc sử dụng nhiều enzym khác nhau trong việc sản xuất chiết xuất cà phê để cải thiện chất lượng sản phẩm và tính kinh tế của quy trình xử lý đã được đề xuất (xem, ví dụ, US4,983,408, WO2007/011531, US5,714,183). Việc sử dụng mananaza trong sản xuất chiết xuất cà phê tan được đã được bộc lộ trong, ví dụ, WO2007/011531 và US5,714,183.

Mục đích của sáng chế là thu được chiết xuất cà phê có sản lượng chất rắn tan được cao.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Tác giả sáng chế đã xác định enzym mananaza mới và thể hiện rằng chúng hữu dụng để chiết cà phê rang và xay do đó tạo ra sản lượng cao chất khô trong chiết xuất cà phê thu được.

Sáng chế do đó đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
- c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
- d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
- e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 18.

Tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng các enzym mananaza chịu nhiệt là đặc biệt hữu dụng để chiết cà phê rang và xay. Chiết xuất cà phê thu được có sản lượng chất khô cao. Việc sử dụng enzym mananaza chịu nhiệt là lợi ích của việc sản xuất chiết xuất cà phê vì nó cho phép chiết ở nhiệt độ cao hơn. Nói chung, chiết ở nhiệt độ cao sẽ cho sản lượng cao hơn. Tương tự, nhiệt độ cao sẽ làm giảm sự phát triển của vi khuẩn. Hơn nữa, trong quy trình chiết từng giai đoạn dùng trong việc sản xuất chiết xuất cà phê, việc chiết ở nhiệt độ rất cao có thể tiến hành ngay trước khi chiết trong đó enzym mananaza được áp dụng, và việc sử dụng mananaza chịu nhiệt sẽ cho phép làm nguội ít hơn giữa hai lần chiết.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế do đó đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;

c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;

d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và

e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza là chịu nhiệt được.

Tốt hơn là, enzym có hoạt tính mananaza có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất  $80^{\circ}\text{C}$ , tốt hơn là ít nhất  $85^{\circ}\text{C}$  hoặc ít nhất  $90^{\circ}\text{C}$ .

Tốt hơn là, việc ủ trong bước d. được thực hiện ở nhiệt độ bằng ít nhất  $60^{\circ}\text{C}$  như ít nhất  $65^{\circ}\text{C}$ , tốt hơn là ít nhất  $70^{\circ}\text{C}$  như ít nhất  $75^{\circ}\text{C}$  hoặc ít nhất  $80^{\circ}\text{C}$ .

Tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng enzym mananaza bao gồm vùng liên kết CBM1 là đặc biệt hữu dụng để chiết cà phê rang và xay.

Theo cạnh thứ ba, sáng chế do đó đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;

b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;

c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;

d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và

e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza bao gồm vùng liên kết CBM1.

Theo cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, được chọn từ nhóm bao gồm:



(a) polypeptit có ít nhất 75% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3;

(b) polypeptit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; và

(c) polypeptit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 75% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii);

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 75% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự cADN của chúng;

(d) biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3 bao gồm thế, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí; và

(e) đoạn của polypeptit của (a), (b), (c), hoặc (d) mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii);

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự cADN của chúng;

(d) biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí; và

(e) đoạn của polypeptit của (a), (b), (c), hoặc (d) mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii);

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự cADN của chúng;

(d) biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí; và

(e) đoạn của polypeptit của (a), (b), (c), hoặc (d) mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

Định nghĩa

Mananaza: Trong bối cảnh của sáng chế "mananaza" là beta-mananaza. Nó có thể là enzym được xác định trong lĩnh vực là endo-beta-1,4-mananaza (EC 3.2.1.78) mà xúc tác việc thủy phân của liên kết 1,4-beta-D-mannosidic trong mannan, galactomannan và glucomannan, enzym mà có tên khác là mannan endo-1,4-beta-mannosidaza; 1,4-beta-D-mannan mannanohydrolaza; endo-1,4-beta-mananaza; beta-mananaza B; beta-1,4-mannan 4-mannanohydrolaza; endo-beta-mananaza; và beta-D-mananaza. Cho các mục đích của sáng chế, hoạt tính mananaza có thể được xác định sử dụng thử nghiệm hoạt tính được mô tả bởi Staalbrand và cộng sự. (1993), Purification and characterization of two beta-mannanases from *Trichoderma reesei*, J. Biotechnol., 29:229–42. Theo một khía cạnh, mananaza để dùng trong phương pháp theo sáng chế có ít nhất 20%, ví dụ, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 100% hoạt tính mananaza của polypeptit của số truy cập GENESEQP AXU66990 được thể hiện ở đây là SEQ ID NO: 16.

Biến thể alen: Thuật ngữ "biến thể alen" nghĩa là bất kỳ trong số hai hoặc nhiều dạng tùy ý của gen chiếm cùng vị trí nhiễm sắc thể. Sự biến đổi alen xảy ra tự nhiên thông qua đột biến, và có thể tạo ra đa hình trong các quần thể. Đột biến gen có thể là câm (không có thay đổi trong polypeptit được mã hóa) hoặc có thể mã hóa polypeptit có trình tự axit amin thay đổi. Biến thể alen của polypeptit là polypeptit được mã hóa bởi biến thể alen của gen.

Vùng xúc tác: Thuật ngữ "vùng xúc tác" nghĩa là vùng của enzym chứa cơ chế xúc tác của enzym.

cADN: Thuật ngữ "cADN" nghĩa là phân tử ADN mà có thể được điều chế bằng cách phiên mã ngược từ phân tử mRNA, chín muối, nối bện, thu được từ tế bào nhân thực hoặc nhân sơ. cADN không có trình tự intron mà có thể có mặt trong ADN bộ gen tương ứng. Bản mã ARN ban đầu, cơ bản là tiền thân của mRNA mà được xử lý qua nhiều bước, bao gồm nối bện, trước khi trở thành mRNA nối bện, chín muối.

Mã hóa trình tự: Thuật ngữ "mã hóa trình tự" nghĩa là polynucleotit, mà định rõ trực tiếp trình tự axit amin của polypeptit. Ranh giới của việc mã hóa trình tự thường được xác định bằng khung đọc mở, mà bắt đầu với bộ ba mã hóa khởi đầu như ATG, GTG, hoặc

TTG và kết thúc với bộ ba mã hóa kết thúc như TAA, TAG, hoặc TGA. Việc mã hóa trình tự có thể là ADN bộ gen, cADN, ADN tổng hợp, hoặc kết hợp của chúng.

Trình tự đối chứng: Thuật ngữ "trình tự đối chứng" nghĩa là trình tự axit nucleic cần để biểu hiện polynucleotit mã hóa polypeptit chín muối theo sáng chế. Mỗi trình tự đối chứng có thể là tự nhiên (*tức là*, từ cùng gen) hoặc lạ (*tức là*, từ gen khác nhau) đối với polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc tự nhiên hoặc lạ với nhau. Trình tự đối chứng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự dẫn đầu, trình tự polyadenyl hóa, trình tự propeptit, vùng tăng cường, trình tự peptit tín hiệu, và trình tự kết thúc phiên mã. Ở mức nhỏ nhất, trình tự đối chứng bao gồm vùng tăng cường, và tín hiệu kết thúc phiên mã và dịch mã. Trình tự đối chứng có thể được đề xuất với liên kết nhằm mục đích đưa vào vị trí giới hạn cụ thể tạo điều kiện cho việc buộc thắt trình tự đối chứng với vùng mã hóa của polynucleotit mã hóa polypeptit.

Biểu hiện: Thuật ngữ "biểu hiện" bao gồm bước bất kỳ liên quan đến việc sản xuất polypeptit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phiên mã, biến đổi sau phiên mã, dịch mã, biến đổi sau dịch mã, và bài tiết.

Vectơ biểu hiện: Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" nghĩa là phân tử ADN thẳng hoặc vòng mà bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit và liên kết hoạt động với trình tự đối chứng mà tạo ra biểu hiện của nó.

Đoạn: Thuật ngữ "đoạn" nghĩa là polypeptit có một hoặc nhiều (*ví dụ*, một vài) axit amin không có từ đầu amin và/hoặc carboxyl của polypeptit hoặc vùng chín muối; trong đó đoạn có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza. Theo một khía cạnh, đoạn của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3 bao gồm ít nhất 350 gốc axit amin, ít nhất 375 gốc axit amin, hoặc ít nhất 400 gốc axit amin. Theo một khía cạnh, đoạn của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bao gồm ít nhất 300 gốc axit amin, ít nhất 315 gốc axit amin, hoặc ít nhất 330 gốc axit amin. Theo một khía cạnh, đoạn của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bao gồm ít nhất 300 gốc axit amin, ít nhất 315 gốc axit amin, hoặc ít nhất 330 gốc axit amin.

Các điều kiện nghiêm ngặt cao: Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt cao" nghĩa là mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE,

0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 50% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 65°C.

Tế bào chủ: Thuật ngữ "tế bào chủ" nghĩa là loại tế bào bất kỳ mà để biến nạp, chuyển nạp, tải nạp, hoặc tương tự với cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ" bao gồm bất kỳ con cái của tế bào bố mẹ mà không tương đồng với tế bào bố mẹ do các đột biến mà xảy ra trong quá trình sao chép.

Được phân lập: Thuật ngữ "được phân lập" nghĩa là chất ở dạng hoặc môi trường mà không có trong tự nhiên. Các ví dụ không giới hạn của chất được phân lập bao gồm (1) chất bất kỳ xảy ra không tự nhiên, (2) chất bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bất kỳ enzym, biến thể, axit nucleic, protein, peptit hoặc đồng yếu tố, mà được loại bỏ ít nhất một phần từ một hoặc nhiều hoặc tất cả trong số các thành phần xảy ra trong tự nhiên mà với nó được kết hợp với chúng trong tự nhiên; (3) chất bất kỳ được biến đổi bởi bàn tay con người so với chất tìm thấy trong tự nhiên; hoặc (4) chất bất kỳ được biến đổi bằng cách làm tăng lượng chất so với các thành phần khác mà nó kết hợp với một cách tự nhiên (ví dụ, sản xuất tái tổ hợp trong tế bào chủ; nhiều bản sao của gen mã hóa chất; và việc sử dụng vùng tăng cường mạnh hơn vùng tăng cường kết hợp tự nhiên với gen mã hóa chất).

Điều kiện nghiêm ngặt thấp: Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt thấp" nghĩa là mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 25% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 50°C.

Polypeptit chín muối: Thuật ngữ "polypeptit chín muối" nghĩa là polypeptit ở dạng cuối cùng của nó sau khi dịch mã và bất kỳ cải biến sau dịch mã, như xử lý đầu N, cắt cụt đầu C, glycosyl hóa, phosphoryl hóa, v.v. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 2 là axit amin 18-431 nêu ở SEQ ID NO: 2. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 7 là axit amin 18-367 nêu ở SEQ ID NO: 7. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID

NO: 12 là axit amin 18-361 nêu ở SEQ ID NO: 12. Đã biết trong lĩnh vực rằng tế bào chủ có thể tạo ra hỗn hợp của hai hoặc nhiều polypeptit chín muối khác nhau (*tức là*, với axit amin đầu C và/hoặc đầu N khác nhau) được biểu hiện bởi cùng polynucleotit. Cũng đã biết trong lĩnh vực rằng tế bào chủ khác nhau xử lý polypeptit một cách khác nhau, và do đó, một tế bào chủ biểu hiện polynucleotit có thể tạo ra polypeptit chín muối khác nhau (*ví dụ*, có axit amin đầu C và/hoặc đầu N khác nhau) khi so với tế bào chủ khác biểu hiện cùng polynucleotit.

Polypeptit chín muối mã hóa trình tự: Thuật ngữ "polypeptit chín muối mã hóa trình tự" nghĩa là polynucleotit mà mã hóa polypeptit chín muối có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1 là nucleotit 52 đến 1545 nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự cADN của chúng. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6 là nucleotit 52 đến 1219 nêu ở SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự cADN của chúng. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11 là nucleotit 52 đến 1200 nêu ở SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự cADN của chúng.

Các điều kiện nghiêm ngặt trung bình: Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt trung bình" nghĩa là các mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 35% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 55°C.

Các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao: Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao" nghĩa là các mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 35% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 60°C.

Cấu trúc axit nucleic: Thuật ngữ "cấu trúc axit nucleic" nghĩa là phân tử axit nucleic, hoặc là chuỗi đơn hoặc chuỗi đôi, mà được phân lập từ gen có trong tự nhiên hoặc được

biến đổi để chứa phân đoạn của axit nucleic theo cách mà không thể tồn tại khác trong tự nhiên hoặc được tổng hợp, mà bao gồm một hoặc nhiều trình tự đối chứng.

Liên kết hoạt động: Thuật ngữ "liên kết hoạt động" nghĩa là cấu hình trong đó trình tự đối chứng được đặt ở vị trí thích hợp so với trình tự mã hóa của polynucleotit sao cho trình tự đối chứng định hướng biểu hiện của trình tự mã hóa.

Tương đồng trình tự: Tính liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai trình tự nucleotit được mô tả bởi thông số "tương đồng trình tự".

Cho các mục đích của sáng chế, tương đồng trình tự giữa hai trình tự axit amin được xác định sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) như được cài đặt trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice và cộng sự, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản muộn hơn. Các tham số được sử dụng là điểm phạt mở quãng cách bằng 10, điểm phạt kéo dài quãng cách bằng 0,5, và ma trận thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Đầu ra của Needle được gắn nhãn "độ tương đồng dài nhất" (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn –nobrief) được sử dụng dưới dạng tỷ lệ phần trăm độ tương đồng và được tính như sau:

$$(\text{Số gốc Tương đồng} \times 100) / (\text{Chiều dài của Đoạn sắp thẳng hàng} - \text{Tổng số Quãng cách trong Đoạn sắp thẳng hàng})$$

Cho các mục đích của sáng chế, tương đồng trình tự giữa hai trình tự deoxyribonucleotit được xác định sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *trước đây*) như được cài đặt trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice và cộng sự, 2000, *trước đây*), tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc muộn hơn. Các tham số được sử dụng là điểm phạt mở quãng cách bằng 10, điểm phạt kéo dài quãng cách bằng 0,5, và ma trận thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4). Đầu ra của Needle được gắn nhãn "độ tương đồng dài nhất" (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn –nobrief) được sử dụng dưới dạng tỷ lệ phần trăm độ tương đồng và được tính như sau:

(Số deoxyribonucleotit Tương đồng x 100)/(Chiều dài của Đoạn sắp thẳng hàng – Tổng số Quãng cách trong Đoạn sắp thẳng hàng)

Dưới trình tự: Thuật ngữ "dưới trình tự" nghĩa là polynucleotit có một hoặc nhiều (ví dụ, một vài) nucleotit không có từ đầu 5' và/hoặc 3' của polypeptit chín muối mã hóa trình tự; trong đó dưới trình tự mã hóa đoạn có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

Biến thể: Thuật ngữ "biến thể" nghĩa là polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza bao gồm thay đổi, tức là, thế, chèn, và/hoặc loại bỏ, ở một hoặc nhiều (ví dụ, một vài) vị trí. Thế nghĩa là thay axit amin chiếm vị trí với axit amin khác; loại bỏ nghĩa là loại đi axit amin chiếm vị trí; và chèn nghĩa là thêm vào một hoặc nhiều axit amin liên kế với và ngay sau axit amin chiếm vị trí.

Các điều kiện nghiêm ngặt rất cao: Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt rất cao" nghĩa là mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 50% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 70°C.

Điều kiện nghiêm ngặt rất thấp: Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt rất thấp" nghĩa là mẫu dò có chiều dài bằng ít nhất 100 nucleotit, lai trước và lai ở 42°C trong 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgram/ml ADN tinh dịch cá hồi được cắt và lắng gạn, và 25% formamit, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn trong 12 đến 24 giờ. Vật liệu mang được rửa cuối cùng ba mỗi lần trong 15 phút sử dụng 2X SSC, 0,2% SDS ở 45°C.

Polypeptit chín muối: Thuật ngữ "polypeptit chín muối" nghĩa là polypeptit ở dạng cuối cùng của nó sau khi dịch mã và bất kỳ biến đổi sau dịch mã, như xử lý đầu N, cắt cụt đầu C, glycosyl hóa, phosphoryl hóa, v.v. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 2 là axit amin 18-431 nêu ở SEQ ID NO: 2. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 7 là axit amin 18-367 nêu ở SEQ ID NO: 7. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 12 là axit amin 18-361 nêu ở SEQ ID NO: 12. Theo một khía cạnh, polypeptit chín muối của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 17 là axit amin 28-319 nêu ở SEQ ID NO: 17 (trên



cơ sở việc sắp trình tự đầu N và sắc phổ khối (MS) của protein chiều dài đầy đủ). Đã biết trong lĩnh vực rằng tế bào chủ có thể tạo ra hỗn hợp của hai hoặc nhiều polypeptit chín muồi khác nhau (*tức là*, với axit amin đầu C và/hoặc đầu N khác nhau) được biểu hiện bởi cùng polynucleotit. Cũng đã biết trong lĩnh vực rằng tế bào chủ khác nhau xử lý polypeptit một cách khác nhau, và do đó, một tế bào chủ biểu hiện polynucleotit có thể tạo ra polypeptit chín muồi khác nhau (*ví dụ*, axit amin có đầu C và/hoặc đầu N khác nhau) khi so với tế bào chủ khác biểu hiện cùng polynucleotit.

Chịu nhiệt: Trong bối cảnh của sáng chế, enzym chịu nhiệt có hoạt tính mananaza có thể có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất 80°C, tốt hơn là ít nhất 85°C, tốt hơn nữa là ít nhất 90°C.  $T_m$  có thể được xác định như được mô tả trong phần Ví dụ.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế theo một khía cạnh đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
- c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
- d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
- e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 18.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3 bằng ít nhất 60%, ví dụ, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất

94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, enzym khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3. Theo một phương án, enzym này là chịu nhiệt được.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 3 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính mananaza. Theo khía cạnh khác, enzym bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 3. Theo một phương án, enzym này là chịu nhiệt được.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 18 bằng ít nhất 60%, ví dụ, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, enzym khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 18. Theo một phương án, enzym này là chịu nhiệt được.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 18 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính mananaza. Theo khía cạnh khác, enzym bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 18. Theo một phương án, enzym này là chịu nhiệt được.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bằng ít nhất 60%, ví dụ, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, enzym khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 8 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính mananaza. Theo khía cạnh khác, enzym bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 8.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bằng ít nhất 60%, ví dụ, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, enzym khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 13 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính mananaza. Theo khía cạnh khác, enzym bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 13.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
  - c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
  - d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
  - e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,
- trong đó enzym có hoạt tính mananaza là chịu nhiệt được.

Mô tả và các phương án dưới đây là liên quan đến cả hai trong các khía cạnh này của sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên, enzym có hoạt tính mananaza có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất 80°C, tốt hơn là ít nhất 85°C, tốt hơn nữa là ít nhất 90°C. Nhiệt độ nóng chảy  $T_m$  có thể được xác định như được mô tả trong phần Ví dụ.

Theo phương án được ưu tiên, việc ủ được thực hiện ở nhiệt độ bằng ít nhất 60°C như ít nhất 65°C, tốt hơn là ít nhất 70°C như ít nhất 75°C hoặc ít nhất 80°C.

Theo phương án được ưu tiên khác, việc ủ được thực hiện ở nhiệt độ thường nằm trong khoảng từ khoảng 50°C đến khoảng 100°C, tốt hơn là khoảng 60°C đến khoảng 100°C, tốt hơn nữa là khoảng 70°C đến khoảng 100°C, còn tốt hơn nữa là khoảng 80°C đến khoảng 100°C.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza được phân lập.

Theo một khía cạnh, enzym có hoạt tính mananaza là endo-beta-1,4-mananaza, tốt hơn là GH5 endo-beta-1,4-mananaza, tốt hơn nữa là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza hoặc GH5\_8 endo-beta-1,4-mananaza. Theo phương án được ưu tiên, enzym có hoạt tính mananaza là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza. Theo phương án được ưu tiên khác, enzym có hoạt tính mananaza là GH5\_8 endo-beta-1,4-mananaza.

Enzym có hoạt tính mananaza theo sáng chế có thể thu được từ vi sinh vật của giống bất kỳ. Cho các mục đích của sáng chế, thuật ngữ "thu được từ" như được sử dụng ở đây liên quan đến nguồn được cho sẽ có nghĩa là polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được tạo ra bởi nguồn hoặc bởi chủng trong đó polynucleotit từ nguồn được chèn vào. Theo một khía cạnh, polypeptit thu được từ nguồn được cho được bài tiết ngoài tế bào.

Enzym có thể là enzym nấm. Ví dụ, enzym có thể thu được từ nấm men như từ *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Yarrowia*; hoặc từ nấm dạng sợi như từ *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, hoặc *Xylaria*.

Theo phương án khác, enzym thu được từ *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, hoặc *Saccharomyces oviformis*.

Theo phương án khác, enzym thu được từ *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, hoặc *Trichoderma viride*.

Theo một phương án, enzym thu được từ *Talaromyces*, ví dụ, từ *Talaromyces leycettanus*.

Theo phương án khác, enzym thu được từ *Chaetomium*, ví dụ, từ *Chaetomium virescens*.

Theo phương án khác, enzym thu được từ *Sordaria*, ví dụ, từ *Sordaria macrospora*.

Theo phương án khác, enzym thu được từ *Caldicellulosiruptor*, ví dụ, từ *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

Cần hiểu rằng đối với các loài nêu trên, sáng chế bao gồm cả trạng thái hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, và tương đương phân loại khác, ví dụ, tiệt biến, bất kể tên loài mà được biết. Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ nhận ra nhận dạng của các tương đương thích hợp.

Các chủng của các loài này đã được tiếp cận đến công chúng bằng nhiều ngân hàng nuôi cấy, như Ngân hàng giống tế bào của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), và Ngân hàng nuôi cấy sáng chế dịch vụ nghiên cứu nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection), Trung tâm nghiên cứu vùng phía Bắc (Northern Regional Research Center - NRRL).

Polypeptit có thể được xác định và thu được từ các nguồn khác bao gồm vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, v.v.) hoặc các mẫu ADN thu được trực tiếp từ vật liệu tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, v.v.) sử dụng các mẫu dò nêu trên. Các kỹ thuật phân lập vi sinh vật và ADN trực tiếp từ môi trường tự nhiên là đã biết trong lĩnh vực. Polynucleotit mã hóa polypeptit sau đó có thể thu được bằng cách sàng tương tự ADN bộ gen hoặc ngân hàng cADN của vi sinh vật khác hoặc mẫu ADN hỗn hợp. Khi polynucleotit mã hóa polypeptit được phát hiện với (các) mẫu dò, polynucleotit có thể được phân lập hoặc được tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Sambrook và cộng sự, 1989, trước đây).

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza không thu được từ *Aspergillus niger*.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng cho hạt cà phê rang và xay mới hoặc cho hạt cà phê rang mà đã được chiết trước với nước.

Theo phương án được ưu tiên, hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.

Theo một khía cạnh, một bước chiết thứ nhất được thực hiện ở bước b.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng để xay hạt cà phê thu được bằng cách xử lý cà phê tan thông thường. Ở đây, cà phê rang thường được xay và được chiết (dưới nhiệt độ) với nước ở nhiều giai đoạn. Việc thực hiện hai giai đoạn là thông thường

trong lĩnh vực, trong đó giai đoạn thứ nhất bao gồm làm ướt bã cà phê, thu hương vị và chiết thành phần tan được đã có (như cafein, chất khoáng và đường đơn). Giai đoạn thứ hai thường là giai đoạn thủy phân, trong đó các polyme sinh học lớn của cà phê và các thành phần liên kết được đập vỡ thành các thành phần nhỏ hơn tan trong nước. Ở giai đoạn thứ nhất, cà phê rang thường được chiết với nước ở hoặc dưới 100°C. Bã của việc chiết này, mà có thể gọi là "nền khí quyển", sau đó được chiết với nước quá nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 140°C đến 180°C hoặc thậm chí cao hơn. Bã được chiết một phần từ việc chiết quá nhiệt có thể được gọi là "bã quá nhiệt".

Nếu phương pháp theo sáng chế được áp dụng cho bã được chiết một phần, bước chiết thứ nhất có thể được thực hiện bằng cách thêm cà phê rang và xay mà có thể có kích thước hạt trung bình bằng khoảng 900 micron đến bể khuấy có vỏ bọc mà bao gồm nước, trong đó tỷ lệ chất rắn so với nước bằng khoảng 1:5. Bột nhão được khuấy, được gia nhiệt gián tiếp đến nhiệt độ ít hơn khoảng 140°C, tốt hơn là trong khoảng từ khoảng 85-90°C, và được giữ ở nhiệt độ này trong khoảng 30 phút. Bột nhão sau đó được loại ra khỏi bình và bã tiếp theo và chiết xuất được phân tách sử dụng thiết bị lọc. Bã được chiết một phần được đưa qua chiết lần thứ hai theo sáng chế và chiết xuất được tạo ra trong bước chiết thứ nhất (bước b) có thể được trộn với chiết xuất thứ hai thu được ở bước e.

Tương tự, việc thực hiện nhiều giai đoạn (tức là, nhiều hơn hai lần chiết) là thông thường trong lĩnh vực. Sau giai đoạn thứ nhất, nhiều giai đoạn sau đó được thực hiện. Phương pháp theo sáng chế có thể là một phần của việc chiết nhiều giai đoạn. Bã được chiết một phần mà được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất được đưa qua chiết theo sáng chế và chiết xuất được tạo ra trong một hoặc nhiều lần chiết trước đó có thể được trộn với chiết xuất thu được ở bước e.

Trong bối cảnh của sáng chế, hạt cà phê xay được chiết một phần hoặc bã cà phê được chiết một phần nghĩa là hạt cà phê xay được đưa qua ít nhất một lần chiết. Hạt cà phê được chiết một phần này còn có thể gọi là bã cà phê pha rồi.

Phương pháp theo sáng chế có thể, nói chung, được áp dụng để rang và xay cà phê bao gồm hạt cà phê được rang mà được xay đến kích thước hạt trung bình nằm trong

khoảng từ khoảng 0,1 đến khoảng 5 mm, tốt hơn là trong khoảng từ khoảng 0,2 đến khoảng 1 mm.

Ngoài ra, bước xử lý trước quản lý hương vị có thể được thêm vào phương pháp theo sáng chế để thu hợp chất mùi thơm hoặc cấu thành thơm của cà phê trước giai đoạn chiết và/hoặc thủy phân. Các quy trình hữu dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các quy trình được mô tả trong EP 0 489 401. Việc thực hiện thực tế bao gồm làm ướt cà phê rang và xay với nước trong bình với tỷ lệ bằng khoảng 1:0.5 theo khối lượng. Chân không được áp dụng vào bình (ví dụ, khoảng 150 mbar) và sau đó hơi áp suất thấp được áp dụng lên tầng bã đã làm ướt trong đến khoảng 4 đến 8 phút để làm bay hơi hợp chất mùi thơm từ cà phê rang và xay. Hợp chất dễ bay hơi được rút ra được cô đặc, ví dụ ở khoảng 5°C và được duy trì để thêm trở lại chiết xuất hoặc chất rắn được chiết.

Phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện trên cà phê rang mà được xả hơi ở áp suất thấp để chiết thành phần hương dễ bay hơi, như được mô tả ở trên.

Phương pháp theo sáng chế có thể có thể được áp dụng cho loại bã cà phê bất kỳ với chất thủy phân được đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực, như bã cà phê tách dầu, bã cà phê tách cafein, bã cà phê nghiền ướt, bã cà phê được xử lý asparaginaza, v.v.

Việc xử lý enzym của hạt cà phê rang và xay được thực hiện ở nhiệt độ trong đó enzym là hoạt tính và đủ lâu để cho phép phản ứng enzym.

Theo một cách thao tác mở có thể, sau khi phản ứng enzym cơ bản hoàn thành, hỗn hợp được đưa qua phân tách tổng, ví dụ ly tâm hoặc lọc đai, mà loại hầu hết chất rắn không tan. Chiết xuất được phân tách, vẫn chứa các hạt mịn, dầu và enzym protein, được tuần hoàn lại qua thiết bị chảy qua màng, mà loại tất cả chất không tan và còn có thể loại ra enzym. Hầu hết hoặc tất cả enzym còn trong chất thấm tích lại màng và có thể được tái chế cho phản ứng.

Theo một cách thao tác có thể, chất thấm qua màng bán thấm được rút ra cố định trong phản ứng enzym, tức là một phần của hỗn hợp phản ứng được tuần hoàn liên tục qua tế bào phân tách màng bán thấm chảy qua. Quy trình này có thể hoạt động theo cách bán liên tục, trong đó chất thấm qua được rút ra đến khi thể tích trong bình phản ứng giảm



xuống điểm trong đó độ nhớt của nó hoặc giọt áp suất trở nên cao. Ở điểm này, một số chất thấm tích lại được tách khí và bột nhão cà phê mới được nạp và một số enzym mới được thêm vào. Chất thấm tích lại tách khí có thể được loại ra hoặc có thể được rửa để thu enzym mà sau đó được dùng lại. Enzym trong chất thấm tích lại còn lại (không được tách khí) được duy trì và dùng lại.

Tùy ý, bột nhão nạp mới có thể được thêm liên tục vào bể nạp cùng với một số enzym với khí tách rút ra từ hơi tái sinh của thể tích bằng nhau.

Trong mọi trường hợp, việc chạy quy trình theo cách thao tác bán liên tục hoặc liên tục cho phép sự thấm qua của thành phần tan ngoài vùng phản ứng trước khi chúng có thể bị đập vỡ thêm.

Nếu phương pháp theo sáng chế được dùng để xử lý bã từ cà phê rang và xay mà được chiết trước đó với nước và/hoặc thủy phân nhiệt, chiết xuất thu được từ phương pháp theo có thể được kết hợp với chiết xuất thu được trước.

Trong đó nền khí quyển được dùng làm chất nạp vào phương pháp theo sáng chế, chiết xuất tạo ra có thể được kết hợp với chiết xuất thu được trong giai đoạn chiết khí quyển. Chiết xuất được kết hợp trên cơ sở tỷ lệ sản lượng rang được chiết từ mỗi giai đoạn. Chiết xuất được kết hợp sau đó được cô đặc, được tạo mùi và làm khô như thông thường trong lĩnh vực.

Chiết xuất cà phê có thể được khử nước, như cà phê tan được hoặc chế phẩm hỗn hợp khô, hoặc có thể là sản phẩm cà phê uống liền, chế phẩm hỗn hợp lỏng, chế phẩm đông lạnh hoặc chế phẩm đậm đặc lỏng. Chiết xuất cà phê theo sáng chế còn có thể được sử dụng trong ứng dụng không phải là đồ uống, như đồ tráng miệng dùng ngay hoặc sản phẩm bánh kẹo v.v.

Quy trình để tạo ra các chế phẩm cà phê này từ chiết xuất cà phê tan được là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Theo phương pháp theo sáng chế, nước và enzym được thêm vào hạt cà phê mà có thể được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất.

Nước có thể, ví dụ, được thêm sao cho nồng độ cuối của chất khô nằm trong khoảng 2%-30% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là trong khoảng 5%-20% (khối lượng/khối lượng), như khoảng 10% (khối lượng/khối lượng).

Enzym có hoạt tính mananaza có thể được thêm ở nồng độ bằng ít nhất 0,001 g enzym protein /kg chất khô, tốt hơn là ít nhất 0,005 g enzym protein /kg chất khô, như ở nồng độ bằng 0,001-1 g enzym protein /kg chất khô, tốt hơn là 0,005-0,5 g enzym protein /kg chất khô.

Enzym có hoạt tính mananaza có thể được thêm ở nồng độ bằng ít nhất 0,001 g enzym protein /kg hạt cà phê, tốt hơn là ít nhất 0,005 g enzym protein /kg hạt cà phê, như ở nồng độ bằng 0,001-0,5 g enzym protein /kg hạt cà phê, tốt hơn là 0,005-0,2 g enzym protein /kg hạt cà phê.

Enzym có hoạt tính mananaza tốt hơn là được thêm là chế phẩm enzym khác biệt ở chỗ ít nhất 5%, tốt hơn là ít nhất 10% hoặc ít nhất 20%, của tổng protein trong chế phẩm là enzym có hoạt tính mananaza là hoạt tính enzym trội của nó.

Enzym có hoạt tính mananaza có thể được thêm là hỗn hợp với các enzym khác như, ví dụ, xenlulaza và/hoặc (các) enzym galactanaza.

Theo phương pháp theo sáng chế, sau nước và enzym được thêm vào hạt cà phê rang và xay mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, chế phẩm bao gồm hạt cà phê, nước và enzym được ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước.

Việc ủ được thực hiện ở nhiệt độ trong đó enzym là hoạt tính, thường trong khoảng từ khoảng 25°C đến khoảng 100°C. Theo các khía cạnh của sáng chế trong đó enzym chịu nhiệt được sử dụng, việc ủ có thể được thực hiện ở nhiệt độ thường nằm trong khoảng từ khoảng 50°C đến khoảng 100°C, tốt hơn là khoảng 60°C đến khoảng 100°C, tốt hơn nữa là khoảng 70°C đến khoảng 100°C, còn tốt hơn nữa là khoảng 80°C đến khoảng 100°C.

Việc ủ có thể được thực hiện trong khoảng 1 đến khoảng 48 giờ, tốt hơn là khoảng 2 đến khoảng 24 giờ hoặc khoảng 4 đến khoảng 24 giờ để cho phép phản ứng enzym.

Sau khi ủ, chiết xuất cà phê được tách khỏi hạt cà phê được chiết xuất bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c, một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất được nêu như bước b, và nỗ hoi nước được thực hiện sau bước b và trước bước c. Tùy ý, nếu nhiều hơn một bước chiết thứ nhất được thực hiện, việc nỗ hoi nước có thể được thực hiện giữa một số trong các bước chiết thứ nhất và trước bước c.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c, một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất được nêu như bước b, và bước nghiền thứ hai hạt cà phê được thực hiện sau bước b và trước bước c. Tùy ý, nếu nhiều hơn một bước chiết thứ nhất được thực hiện, việc bước nghiền thứ hai có thể được thực hiện giữa một số trong các bước chiết thứ nhất và trước bước c.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c, (các) bước chiết thứ nhất được nêu như bước b, và ít nhất 8% theo khối lượng, tốt hơn là ít nhất 10% theo khối lượng, của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e. Theo phương án khác, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c, (các) bước chiết thứ nhất được nêu như bước b, và ít nhất 12% theo khối lượng, tốt hơn là ít nhất 14% theo khối lượng, của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e. Theo phương án khác, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c, (các) bước chiết thứ nhất được nêu như bước b, và 8-40% theo khối lượng, tốt hơn là 10-30% hoặc 12-25% theo khối lượng, của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm nhiều hơn ít nhất 100% chất khô, tốt hơn là nhiều hơn ít nhất 200% hoặc ít nhất 300% chất khô, so với

chiết xuất cà phê được điều chế bằng phương pháp tương tự mà không bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

Trong một số ứng dụng, hàm lượng của monosaccarit tự do trong việc chiết cà phê là quan trọng, vì chúng có thể ảnh hưởng đến vị của chiết xuất cà phê.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm ít nhất 2% theo khối lượng, ví dụ ít nhất 5% hoặc ít nhất 8% theo khối lượng, của monosaccarit tự do trên cơ sở khối lượng của tổng số đường là monosaccarit. Theo phương án khác, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm 2-30% theo khối lượng, ví dụ 5-30% hoặc 8-30% theo khối lượng, của monosaccarit tự do trên cơ sở khối lượng của tổng số đường là monosaccarit.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm ít nhất 2% theo khối lượng của mannoza tự do trên cơ sở tổng khối lượng của chất rắn cà phê tan được. Theo phương án khác, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm 2-5% theo khối lượng của mannoza tự do trên cơ sở tổng khối lượng của chất rắn cà phê tan được.

Theo một phương án, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và hàm lượng mannoza tự do trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e bằng ít nhất 5% theo khối lượng, tốt hơn là ít nhất 10% theo khối lượng, của tổng hàm lượng mannoza trong việc chiết cà phê. Theo phương án khác, hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c và hàm lượng mannoza tự do trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e là 5-30% theo khối lượng, tốt hơn là 10-25% theo khối lượng, của tổng hàm lượng mannoza trong việc chiết cà phê này.

Tổng mannoza trong việc chiết cà phê trong bối cảnh của sáng chế nghĩa là mannoza tự do hòa tan cộng với mannoza được liên kết trong oligosaccarit.

Hàm lượng ít hoặc không có glucoza trong việc chiết cà phê là thông số chất lượng, và hàm lượng glucoza phải dưới 2,46 % theo khối lượng để thích hợp với Mô tả mục thương mại (Commercial Item Description - CID) ngày 16/05/2013, được cấp phép bởi Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA) (<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRD3237484>).

Theo một phương án, chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm dưới 2,46% theo khối lượng, tốt hơn là dưới 2% theo khối lượng, tốt hơn nữa là dưới 1% hoặc dưới 0,5% theo khối lượng, của tổng glucoza trên cơ sở tổng khối lượng của chất rắn cà phê tan được.

Theo một phương án, chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm ít nhất 15% theo khối lượng của tổng mannoza trên cơ sở tổng khối lượng của chất rắn cà phê tan được. Theo phương án khác, chiết xuất cà phê bao gồm 15-30% theo khối lượng của tổng mannoza trên cơ sở tổng khối lượng của chất rắn cà phê tan được.

#### Polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza và polynucleotit mã hóa polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến cấu trúc axit nucleic, vector, và tế bào chủ bao gồm polynucleotit cũng như phương pháp sản xuất và sử dụng polypeptit.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3 bằng ít nhất 75%, ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%, mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza. Theo một khía cạnh, polypeptit khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bằng ít nhất 90%, ví dụ, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%, mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza. Theo một khía cạnh, polypeptit khác biệt

đến 10 axit amin, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit có tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bằng ít nhất 80%, *ví dụ*, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%, mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza. Theo một khía cạnh, polypeptit khác biệt đến 10 axit amin, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

Theo một khía cạnh, polypeptit has được phân lập.

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 3 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza. Theo khía cạnh khác, polypeptit bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 8 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza. Theo khía cạnh khác, polypeptit bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế tốt hơn là bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 13 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza. Theo khía cạnh khác, polypeptit bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 13.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt rất thấp, điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1, (ii) trình tự cADN của chúng], hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii) (Sambrook và *cộng sự*,

1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor, New York).

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt rất thấp, điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6, (ii) trình tự cADN của chúng], hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii).

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt rất thấp, điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11, (ii) trình tự cADN của chúng], hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii).

Polynucleotit nêu ở bất kỳ trong số SEQID NO: 1, 6 hoặc 11 hoặc dưới trình tự của bất kỳ trong số chúng, cũng như polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 2, 7 hoặc 12 hoặc đoạn của bất kỳ trong số chúng, có thể được dùng để thiết kế mẫu dò axit nucleic để xác định và tách dòng ADN mã hóa polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza từ các chủng thuộc các giống hoặc loài khác nhau theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Cụ thể là, mẫu dò này có thể dùng để lai với ADN bộ gen hoặc cADN của tế bào có lợi, theo quy trình Southern blot tiêu chuẩn, để xác định và phân lập gen tương ứng trong đó. Mẫu dò này có thể ngắn hơn đáng kể so với tất cả trình tự, nhưng nên có chiều dài ít nhất 15, ví dụ, ít nhất 25, ít nhất 35, hoặc ít nhất 70 nucleotit. Tốt hơn là, mẫu dò axit nucleic có chiều dài ít nhất 100 nucleotit, ví dụ, ít nhất 200 nucleotit, ít nhất 300 nucleotit, ít nhất 400 nucleotit, ít nhất 500 nucleotit, ít nhất 600 nucleotit, ít nhất 700 nucleotit, ít nhất 800 nucleotit, hoặc ít nhất 900 nucleotit. Cả mẫu dò ADN và ARN có thể được sử dụng. Các mẫu dò thường được dán nhãn để phát hiện gen tương ứng (ví dụ, ví dụ  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , biotin, hoặc avidin). Mẫu dò này thuộc phạm vi của sáng chế.

ADN bộ gen hoặc thư viện cADN được điều chế từ các chủng khác này có thể được sàng lọc đối với ADN mà lai với mẫu dò được mô tả ở trên và mã hóa polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza. ADN bộ gen hoặc ADN khác từ các chủng khác này có thể được phân tách bằng điện di agarosa hoặc polyacrylamit gel, hoặc kỹ thuật phân tách khác. ADN từ các thư viện hoặc ADN được phân tách có thể được chuyển vào và làm bất động trên nitroxenluloza hoặc vật liệu mang thích hợp khác. Để xác định dòng vô tính hoặc ADN mà lai với SEQ ID NO: 1 hoặc dưới trình tự của chúng, vật liệu mang được dùng trong Southern blot.

Cho các mục đích của sáng chế, lai chỉ ra rằng polynucleotit lai với mẫu dò axit nucleic được dán nhãn tương ứng với (i) SEQ ID NO: 1, 6 hoặc 11; (ii) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1, 6 hoặc 11; (iii) trình tự cADN của chúng; (iv) phần bổ sung chiều dài đầy đủ của chúng; hoặc (v) dưới trình tự của chúng; dưới các điều kiện nghiêm ngặt rất thấp đến rất cao. Các phân tử mà mẫu dò axit nucleic lai với nó dưới các điều kiện này có thể được phát hiện sử dụng, ví dụ, màng mỏng tia X hoặc phương pháp phát hiện bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza được mã hóa bởi polynucleotit có tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự cADN của chúng bằng ít nhất 75%, ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza được mã hóa bởi polynucleotit có tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự cADN của chúng bằng ít nhất 90%, ví dụ, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza được mã hóa bởi polynucleotit có tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự cADN của chúng bằng ít nhất 80%, ví



du, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các biến thể của polypeptit nêu ở bất kỳ trong số SEQID NO: 3, 8 hoặc 13 bao gồm thế, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều (ví dụ, một vài) vị trí. Theo một khía cạnh, số lượng thế, loại bỏ và/hoặc chèn axit amin được đưa vào polypeptit nêu ở bất kỳ trong số SEQID NO: 3, 8 hoặc 13 là đến 10, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10. Thay đổi axit amin có thể là của tự nhiên ít, tức là việc thế hoặc chèn axit amin bảo tồn không ảnh hưởng đáng kể đến việc gấp và/hoặc hoạt tính của protein; loại bỏ ít, thường bằng 1-30 axit amin; mở rộng đầu amin hoặc đầu carboxyl ít, như gốc methionin đầu amin; peptit liên kết nhỏ bằng đến 20-25 gốc; hoặc mở rộng ít mà tạo điều kiện cho việc tinh chế bằng cách thay đổi điện tích mạng hoặc chức năng khác, như đặc điểm poly-histidin, epitop kháng nguyên hoặc vùng liên kết.

Các ví dụ của thế bảo tồn là trong nhóm axit amin bazơ (arginin, lysin và histidin), axit amin axit (glutamic axit và aspartic axit), axit amin phân cực (glutamin và asparagin), axit amin kỵ nước (leuxin, isoleuxin và valin), axit amin thơm (phenylalanin, tryptophan và tyrosin), và axit amin nhỏ (glyxin, alanin, serin, threonin và methionin). Các sự thế axit amin mà thường không làm thay đổi hoạt tính đặc hiệu đã được biết đến trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu H. Neurath và R.L. Hill, 1979, *In, The Proteins*, Academic Press, New York. Thế thông thường là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly.

Tùy ý, thay đổi axit amin là của tự nhiên mà đặc điểm lý hóa của polypeptit bị thay đổi. Ví dụ, thay đổi axit amin có thể cải thiện tính ổn định nhiệt của polypeptit, thay đổi tính đặc hiệu chất nền, thay đổi tối ưu pH, và tương tự.

Axit amin thiết yếu trong polypeptit có thể được xác định theo quy trình đã biết trong lĩnh vực, như đột biến hướng điểm hoặc đột biến quét alanin (Cunningham và Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Trong kỹ thuật sau, đột biến alanin đơn được đưa vào mỗi gốc trong phân tử, và phân tử đột biến thu được được thử nghiệm về hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza để xác định gốc axit amin là quan trọng cho hoạt tính của phân tử. Cũng xem tài

liệu, Hilton và cộng sự, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Vị trí hoạt tính của enzym hoặc tương tác sinh học khác cũng có thể được xác định bằng cách phân tích vật lý về cấu trúc, như được xác định bằng các kỹ thuật như cộng hưởng từ nhân, khảo sát tinh thể, nhiễu xạ điện tử, hoặc gắn nhãn ưa ánh sáng, kết hợp với đột biến của axit amin vị trí tiếp xúc giả định. Xem tài liệu, ví dụ, de Vos và cộng sự, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith và cộng sự, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver và cộng sự, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Nhận diện của axit amin thiết yếu còn có thể suy ra từ thuật toán với polypeptit liên quan.

Sự thể, sự loại bỏ, và/hoặc chèn axit amin đơn lẻ hoặc nhiều sự thể, sự loại bỏ, và/hoặc chèn axit amin có thể được tạo ra và được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến, tái tổ hợp, và/hoặc xáo trộn trình tự đã biết, sau đó là quy trình sàng lọc thích hợp, chẳng hạn như quy trình sàng lọc được bộc lộ trong tài liệu Reidhaar-Olson và Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie và Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; hoặc WO 95/22625. Các phương pháp khác mà có thể được sử dụng bao gồm PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, hiển thị phagơ (ví dụ, Lowman và cộng sự, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; bằng sáng chế Mỹ số 5,223,409; WO 92/06204), và gây đột biến định hướng vùng (Derbyshire và cộng sự, 1986, *Gene* 46: 145; Ner và cộng sự, 1988, *DNA* 7: 127).

Phương pháp gây đột biến/xáo trộn trình tự có thể được kết hợp với phương pháp sàng lọc tự động, lưu lượng cao để phát hiện hoạt tính của các polypeptit được tách dòng, được gây đột biến được biểu hiện bởi tế bào chủ (Ness và cộng sự, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Phân tử ADN được gây đột biến mà mã hóa cho polypeptit hoạt tính có thể được thu hồi từ tế bào chủ và được xác định trình tự nhanh chóng bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực. Các phương pháp này cho phép xác định nhanh chóng mức độ quan trọng của gốc axit amin cụ thể trong polypeptit.

Polypeptit có thể là polypeptit lai trong đó vùng của một polypeptit được dung hợp ở đầu N hoặc đầu C của vùng của polypeptit khác.

Polypeptit có thể là polypeptit dung hợp hoặc polypeptit dung hợp phân cắt được trong đó polypeptit khác được dung hợp ở đầu N hoặc đầu C của polypeptit theo sáng chế.

Polypeptit dung hợp được tạo ra bằng cách dung polynucleotit mã hóa polypeptit khác với polynucleotit theo sáng chế. Các kỹ thuật để tạo ra polypeptit dung hợp là đã biết trong lĩnh vực, và bao gồm việc buộc thắt trình tự mã hóa mã hóa polypeptit sao cho chúng trong khung và biểu hiện của polypeptit dung hợp dưới sự kiểm soát của (các) vùng tăng cường giống nhau và trình tự kết thúc. Polypeptit dung hợp còn có thể được cấu trúc bằng cách sử dụng kỹ thuật intein trong đó polypeptit dung hợp được tạo ra sau dịch mã (Cooper và cộng sự, 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson và cộng sự, 1994, *Science* 266: 776-779).

Polypeptit dung hợp có thể còn chứa vị trí phân cắt giữa hai polypeptit. Khi tách protein dung hợp tách ra, vị trí này được cắt ra giải phóng ra hai polypeptit. Ví dụ về vị trí phân cắt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí được bộc lộ trong tài liệu Martin và cộng sự, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-576; Svetina và cộng sự, 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson và cộng sự, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward và cộng sự, 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; và Contreras và cộng sự, 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton và cộng sự, 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie và cộng sự, 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter và cộng sự, 1989, *Proteins: Structure, Function, và Genetics* 6: 240-248; và Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

#### Các nguồn của polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza

Polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza theo sáng chế có thể thu được từ vi sinh vật của giống bất kỳ. Cho các mục đích của sáng chế, thuật ngữ "thu được từ" như được sử dụng ở đây liên quan đến nguồn được cho có nghĩa là polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được tạo ra bởi nguồn hoặc chủng trong đó polynucleotit từ nguồn được chèn vào. Theo một khía cạnh, polypeptit thu được từ nguồn được cho được bài tiết ngoài tế bào.

Polypeptit có thể là polypeptit nấm. Ví dụ, polypeptit có thể là polypeptit nấm như polypeptit *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Yarrowia* polypeptit; hoặc polypeptit nấm dạng sợi như *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*,

*Cryphonectria, Cryptococcus, Diplodia, Exidia, Filibasidium, Fusarium, Gibberella, Holomastigotoides, Humicola, Irpex, Lentinula, Leptosphaeria, Magnaporthe, Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Piomyces, Poitrasia, Pseudoplectania, Pseudotriconympha, Rhizomucor, Schizophyllum, Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella, hoặc Xylaria.*

Theo khía cạnh khác, polypeptit là polypeptit *Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis, hoặc Saccharomyces oviformis.*

Theo khía cạnh khác, polypeptit là polypeptit *Acremonium cellulolyticus, Aspergillus aculeatus, Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola grisea, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Irpex lacteus, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium funiculosum, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Thielavia achromatica, Thielavia albomyces, Thielavia albopilosa, Thielavia australeinsis, Thielavia fimeti, Thielavia microspora, Thielavia ovispora, Thielavia peruviana, Thielavia setosa, Thielavia spededonium, Thielavia subthermophila, Thielavia terrestris, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, hoặc Trichoderma viride.*

Theo một khía cạnh, polypeptit là polypeptit *Talaromyces, ví dụ, polypeptit thu được từ Talaromyces leycettanus.*

Theo khía cạnh khác, polypeptit là polypeptit *Chaetomium*, ví dụ, polypeptit thu được từ *Chaetomium virescens*.

Theo khía cạnh khác, polypeptit là polypeptit *Sordaria*, ví dụ, polypeptit thu được từ *Sordaria macrospora*.

Cần hiểu rằng đối với các loài nêu trên, sáng chế bao gồm cả trạng thái hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, và tương đương phân loại khác, ví dụ, tiệp biến, bất kể tên loài mà được biết. Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ nhận ra nhận dạng của các tương đương thích hợp.

Các chủng của các loài này đã được tiếp cận đến công chúng bằng nhiều ngân hàng nuôi cấy, như Ngân hàng giống tế bào của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), và Ngân hàng nuôi cấy sáng chế dịch vụ nghiên cứu nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection), Trung tâm nghiên cứu vùng phía Bắc (Northern Regional Research Center - NRRL).

Polypeptit có thể được xác định và thu được từ các nguồn khác bao gồm vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, v.v.) hoặc các mẫu ADN thu được trực tiếp từ vật liệu tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, v.v.) sử dụng các mẫu dò nêu trên. Các kỹ thuật phân lập vi sinh vật và ADN trực tiếp từ môi trường tự nhiên là đã biết trong lĩnh vực. Polynucleotit mã hóa polypeptit sau đó có thể thu được bằng cách sàng tương tự ADN bộ gen hoặc ngân hàng cADN của vi sinh vật khác hoặc mẫu ADN hỗn hợp. Khi polynucleotit mã hóa polypeptit được phát hiện với (các) mẫu dò, polynucleotit có thể được phân lập hoặc được tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Sambrook và cộng sự, 1989, trước đây).

#### Vùng xúc tác

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến vùng xúc tác có tương đồng trình tự với axit amin 75 đến 414 nêu ở SEQ ID NO: 3 bằng ít nhất 75%, ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, vùng xúc tác bao gồm axit amin sequences that khác biệt đến

10 axit amin, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, from axit amin 75 to 414 nêu ở SEQ ID NO: 3.

Vùng xúc tác tốt hơn là bao gồm hoặc gồm axit amin 75 đến 414 nêu ở SEQ ID NO: 3 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến vùng xúc tác được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt rất thấp, điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao (như xác định ở trên) với (i) nucleotit 317 đến 1545 nêu ở SEQ ID NO: 1, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii) (Sambrook và cộng sự, 1989, *trước đây*).

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến vùng xúc tác được mã hóa bởi polynucleotit có tương đồng trình tự với nucleotit 317 đến 1545 nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự cADN của chúng bằng ít nhất 75%, *ví dụ*, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%.

Polynucleotit mã hóa vùng xúc tác tốt hơn là bao gồm hoặc gồm nucleotit 317 đến 1545 nêu ở SEQ ID NO: 1.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến vùng xúc tác các biến thể của axit amin 75 đến 414 nêu ở SEQ ID NO: 3 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều (*ví dụ*, một vài) vị trí. Theo một khía cạnh, số thể, loại bỏ và/hoặc chèn axit amin vào trình tự của axit amin 75 đến 414 nêu ở SEQ ID NO: 3 là lên đến 10, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, hoặc 10.

#### Vùng liên kết

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến vùng liên kết CBM1 có tương đồng trình tự với axit amin 1 đến 37 nêu ở SEQ ID NO: 3 bằng ít nhất 75%, *ví dụ*, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%. Theo một khía cạnh, vùng

liên kết CBM1 bao gồm trình tự axit amin mà khác biệt đến 10 axit amin, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với axit amin 1 đến 37 nêu ở SEQ ID NO: 3.

Vùng liên kết CBM1 tốt hơn là bao gồm hoặc gồm axit amin 1 đến 37 nêu ở SEQ ID NO: 3 hoặc biến thể alen của chúng; hoặc là đoạn của chúng có hoạt tính liên kết CBM1.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến vùng liên kết CBM1 được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt rất thấp, điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao (như xác định ở trên) với (i) nucleotit 1 đến 111 nêu ở SEQ ID NO: 1, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii) (Sambrook và *cộng sự*, 1989, *trước đây*).

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến vùng liên kết CBM1 được mã hóa bởi polynucleotit có tương đồng trình tự với nucleotit 1 đến 111 nêu ở SEQ ID NO: 1 bằng ít nhất 75%, *ví dụ*, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100%.

Polynucleotit mã hóa vùng liên kết CBM1 tốt hơn là bao gồm hoặc gồm nucleotit 1 đến 111 nêu ở SEQ ID NO: 1.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến các biến thể vùng liên kết CBM1 của axit amin 1 đến 37 nêu ở SEQ ID NO: 3 bao gồm thế, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều (*ví dụ*, một vài) vị trí. Theo một khía cạnh, số lượng thế, loại bỏ và/hoặc chèn axit amin được đưa vào trình tự của axit amin 1 đến 37 nêu ở SEQ ID NO: 3 là lên đến 10, *ví dụ*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, hoặc 10.

Vùng xúc tác liên kết hoạt động với vùng liên kết CBM1 có thể là từ hydrolaza, isomeraza, ligaza, lyaza, oxidoreductaza, hoặc transferaza, *ví dụ*, aminopeptidaza, amylaza, carbohydraza, carboxypeptidaza, catalaza, xenlobiohydrolaza, xenlulaza, chitinaza, cutinaza, xyclodextrin glycosyltransferaza, deoxyribonucleaza, endoglucanaza, esteraza, alpha-galactosidaza, beta-galactosidaza, glucoamylaza, alpha-glucosidaza, beta-glucosidaza, invertaza, laccaza, lipaza, mannosidaza, mutanaza, oxidaza, enzym

pectinolytic, peroxidaza, phytaza, polyphenoloxidaza, enzym phân giải protein, ribonucleaza, transglutaminaza, xylanaza, hoặc beta-xylosidaza. Polynucleotit mã hóa vùng xúc tác có thể thu được từ bất kỳ nhân sơ, nhân thực, hoặc nguồn khác.

### Polynucleotit

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit, vùng xúc tác, hoặc vùng liên kết CBM1 theo sáng chế, như được mô tả ở đây. Theo một khía cạnh, polynucleotit mã hóa polypeptit, vùng xúc tác, hoặc vùng liên kết CBM1 theo sáng chế được phân lập.

Kỹ thuật được dùng để phân lập hoặc tách dòng polynucleotit là đã biết trong lĩnh vực và bao gồm phân lập từ ADN bộ gen hoặc cADN, hoặc kết hợp của chúng. Việc tách dòng polynucleotit từ ADN bộ gen có thể bị tác động, *ví dụ*, bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) đã biết hoặc sàng lọc kháng thể của thư viện biểu hiện để phát hiện đoạn ADN được tách dòng với các dấu hiệu cấu trúc chung. Xem, *ví dụ*, Innis và cộng sự, 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York. Quy trình khuếch đại axit nucleic khác như phản ứng chuỗi ligaza (LCR), phiên mã hoạt hóa buộc thắt (LAT) và khuếch đại trên cơ sở polynucleotit (NASBA) có thể được sử dụng. Polynucleotit có thể được tách dòng từ chủng của *Talaromyces*, *Chaetomium*, hoặc *Sordaria*, hoặc sinh vật liên quan và do đó, *ví dụ*, có thể là các biến thể alen hoặc loài của polypeptit mã hóa vùng của polynucleotit.

Cải biến của polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế có thể là cần để tổng hợp polypeptit cơ bản tương tự với polypeptit. Thuật ngữ "cơ bản tương tự" với polypeptit đề cập đến dạng không xảy ra trong tự nhiên của polypeptit. Polypeptit này có thể khác biệt theo một số cách được thiết kế gen so với polypeptit được phân lập từ nguồn tự nhiên của nó, *ví dụ*, các biến thể mà khác nhau về hoạt tính đặc hiệu, tính ổn định nhiệt, tối ưu pH, hoặc tương tự. Các biến thể có thể được cấu trúc trên cơ sở polynucleotit được thể hiện là polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 1, 6 hoặc 11, hoặc trình tự cADN của chúng, *ví dụ*, dưới trình tự của chúng, và/hoặc bằng cách đưa vào thể nucleotit mà không tạo rat hay đổi về trình tự axit amin của polypeptit, nhưng tương ứng với việc sử dụng bộ ba mã hóa cả sinh vật chủ nhằm để tạo ra enzym, hoặc bằng cách đưa vào thể nucleotit mà có thể tạo ra tăng đến trình tự axit amin khác nhau. Đối với mô tả chung về



thể nucleotit, xem, ví dụ, Ford và cộng sự, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

### Cấu trúc axit nucleic

Sáng chế còn đề cập đến các cấu trúc axit nucleic bao gồm polynucleotit theo sáng chế liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà định hướng biểu hiện của trình tự mã hóa trong tế bào chủ thích hợp dưới các điều kiện thích hợp với trình tự đối chứng.

Polynucleotit có thể được thao tác theo nhiều cách để tạo ra biểu hiện polypeptit. Thao tác polynucleotit trước khi chèn vào vector có thể là mong muốn hoặc cần thiết phụ thuộc vào vector biểu hiện. Các kỹ thuật để biến đổi polynucleotit sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực.

Trình tự đối chứng có thể là vùng tăng cường, polynucleotit mà được nhận diện bởi tế bào chủ để biểu hiện polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế. Vùng tăng cường bao gồm trình tự đối chứng phiên mã mà trung gian biểu hiện của polypeptit. Vùng tăng cường có thể là bất kỳ polynucleotit mà thể hiện hoạt tính phiên mã trong tế bào chủ bao gồm vùng tăng cường đột biến, cắt cụt, và lai, và có thể thu được từ gen mã hóa polypeptit ngoại bào hoặc nội bào hoặc là tương đồng hoặc khác loại với tế bào chủ.

Các ví dụ của thích hợp vùng tăng cường để định hướng phiên mã của các cấu trúc axit nucleic theo sáng chế trong tế bào chủ vi khuẩn là vùng tăng cường thu được từ gen alpha-amylaza *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen alpha-amylaza *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen penicillinaza *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen maltogenic amylaza *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen levansucraza *Bacillus subtilis* (*sacB*), *Bacillus subtilis xylA* và gen *xylB*, gen *Bacillus thuringiensis cryIIIA* (Agaisse và Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107), vùng tăng cường *E. coli lac* operon, *E. coli trc* (Egon và cộng sự, 1988, *Gene* 69: 301-315), gen agaraza *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), và gen beta-lactamaza nhân sơ (Villa-Kamaroff và cộng sự, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), cũng như vùng tăng cường *tac* (DeBoer và cộng sự, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Các vùng tăng cường khác được mô tả trong "Useful proteins

from recombinant bacteria" trong Gilbert và cộng sự, 1980, *Scientific American* 242: 74-94; và trong Sambrook và cộng sự, 1989, *trước đây*. Các ví dụ của vùng tăng cường đôi được bộc lộ trong WO 99/43835.

Các ví dụ của thích hợp vùng tăng cường để định hướng phiên mã của các cấu trúc axit nucleic theo sáng chế trong tế bào chủ nấm dạng sợi là vùng tăng cường thu được từ gen đối với or *Aspergillus nidulans* acetamidaza, alpha-amylaza trung tính *Aspergillus niger*, alpha-amylaza ổn định axit *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus awamori* glucoamylaza (*glaA*), *Aspergillus oryzae* TAKA amylaza, proteaza kiềm *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* trioza phosphatisomeraza, proteaza giống trypsin *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), *Fusarium venenatum* amyloglucosidaza (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), *Rhizomucor miehei* lipaza, *Rhizomucor miehei* aspartic proteinaza, *Trichoderma reesei* beta-glucosidaza, *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza I, *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza II, *Trichoderma reesei* endoglucanaza I, *Trichoderma reesei* endoglucanaza II, *Trichoderma reesei* endoglucanaza III, *Trichoderma reesei* endoglucanaza V, *Trichoderma reesei* xylanaza I, *Trichoderma reesei* xylanaza II, *Trichoderma reesei* xylanaza III, *Trichoderma reesei* beta-xylosidaza, và yếu tố kéo dài dịch mã *Trichoderma reesei*, cũng như vùng tăng cường NA2-tpi (vùng khởi động được biến đổi từ gen alpha-amylaza trung tính *Aspergillus* trong đó vùng dẫn đầu không dịch mã được thay bằng vùng dẫn đầu không dịch mã từ gen *Aspergillus* trioza phosphatisomeraza; các ví dụ không giới hạn bao gồm vùng khởi động được biến đổi từ gen alpha-amylaza trung tính *Aspergillus niger* trong đó vùng dẫn đầu không dịch mã được thay bằng vùng dẫn đầu không dịch mã từ *Aspergillus nidulans* hoặc gen *Aspergillus oryzae* trioza phosphatisomeraza); và vùng tăng cường đột biến, cắt cụt, và lai của chúng. Các vùng tăng cường khác được mô tả trong Sáng chế Mỹ số 6,011,147.

Trong vật chủ nấm men, vùng tăng cường hữu dụng thu được từ gen đối với *Saccharomyces cerevisiae* enolaza (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* galactokinaza (GAL1), *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenaza rượu/glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (ADH1, ADH2/GAP), *Saccharomyces cerevisiae* trioza phosphatisomeraza (TPI), *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein (CUP1), và

*Saccharomyces cerevisiae* 3-phosphoglycerat kinaza. Các vùng tăng cường hữu dụng khác cho tế bào chủ nấm men được mô tả bởi Romanos và cộng sự, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

Trình tự đối chứng còn có thể là trình tự kết thúc phiên mã, mà được nhận diện bởi tế bào chủ để kết thúc phiên mã. Trình tự kết thúc liên kết hoạt động với đầu 3' của polynucleotit mã hóa polypeptit. Trình tự kết thúc bất kỳ mà có chức năng trong tế bào chủ có thể được sử dụng trong sáng chế.

Trình tự kết thúc được ưu tiên cho tế bào chủ vi khuẩn thu được từ gen đối với *Bacillus clausii* alkaline proteaza (*aprH*), *Bacillus licheniformis* alpha-amylaza (*amyL*), và *Escherichia coli* ARN ribosom (*rrnB*).

Trình tự kết thúc được ưu tiên cho tế bào chủ nấm dạng sợi thu được từ gen đối với *Aspergillus nidulans* acetamidaza, *Aspergillus nidulans* anthranilate synthaza, *Aspergillus niger* glucoamylaza, *Aspergillus niger* alpha-glucosidaza, *Aspergillus oryzae* TAKA amylaza, proteaza giống trypsin *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* beta-glucosidaza, *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza I, *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza II, *Trichoderma reesei* endoglucanaza I, *Trichoderma reesei* endoglucanaza II, *Trichoderma reesei* endoglucanaza III, *Trichoderma reesei* endoglucanaza V, *Trichoderma reesei* xylanaza I, *Trichoderma reesei* xylanaza II, *Trichoderma reesei* xylanaza III, *Trichoderma reesei* beta-xylosidaza, và yếu tố kéo dài dịch mã *Trichoderma reesei*.

Trình tự kết thúc được ưu tiên cho tế bào chủ nấm men thu được từ gen đối với *Saccharomyces cerevisiae* enolaza, *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome C (CYC1), và *Saccharomyces cerevisiae* glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza. Trình tự kết thúc hữu dụng khác cho tế bào chủ nấm men được mô tả bởi Romanos và cộng sự, 1992, trước đây.

Trình tự đối chứng còn có thể là vùng ổn định mRNA xuôi dòng của vùng tăng cường và ngược dòng của trình tự mã hóa của gen mà làm tăng biểu hiện của gen.

Các ví dụ của vùng ổn định mRNA thích hợp thu được từ gen *Bacillus thuringiensis* cryIIIA (WO 94/25612) và gen *Bacillus subtilis* SP82 (Hue và cộng sự, 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).

Trình tự đối chứng còn có thể là trình tự dẫn đầu, vùng không dịch mã của mARN mà quan trọng cho dịch mã bởi tế bào chủ. Trình tự dẫn đầu liên kết hoạt động với đầu 5' của polynucleotit mã hóa polypeptit. Trình tự dẫn đầu bất kỳ mà có chức năng trong tế bào chủ có thể được sử dụng.

Trình tự dẫn đầu được ưu tiên cho tế bào chủ nấm dạng sợi thu được từ gen đối với *Aspergillus oryzae* TAKA amylaza và *Aspergillus nidulans* trioza phosphatisomeraza.

Trình tự dẫn đầu thích hợp cho tế bào chủ nấm men thu được từ gen đối với *Saccharomyces cerevisiae* enolaza (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* 3-phosphoglyxerat kinaza, yếu tố alpha *Saccharomyces cerevisiae*, và *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenaza rượu/glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (ADH2/GAP).

Trình tự đối chứng còn có thể là trình tự polyadenyl hóa, trình tự liên kết hoạt động với đầu 3' của polynucleotit và, khi được phiên mã, được nhận diện bởi tế bào chủ là tín hiệu để thêm gốc polyadenosin vào mARN được phiên mã. Bất kỳ trình tự polyadenyl hóa mà có chức năng trong tế bào chủ có thể được sử dụng.

Trình tự polyadenyl hóa được ưu tiên cho tế bào chủ nấm dạng sợi thu được từ gen đối với *Aspergillus nidulans* anthranilate synthaza, *Aspergillus niger* glucoamylaza, *Aspergillus niger* alpha-glucosidaza, *Aspergillus oryzae* TAKA amylaza, và proteaza giống trypsin *Fusarium oxysporum*.

Trình tự polyadenyl hóa hữu dụng cho tế bào chủ nấm men được mô tả bởi Guo và Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.

Trình tự đối chứng còn có thể là vùng mã hóa peptit tín hiệu mà mã hóa peptit tín hiệu liên kết với đầu N của polypeptit và định hướng polypeptit vào con đường kích thích bài tiết của tế bào. Đầu 5' của trình tự mã hóa của polynucleotit có thể tự nó chứa trình tự mã hóa peptit tín hiệu liên kết tự nhiên trong khung đọc dịch mã với đoạn của trình tự mã hóa mà mã hóa polypeptit. Tùy ý, đầu 5' của trình tự mã hóa có thể bao gồm trình tự mã hóa peptit tín hiệu mà lạ đối với trình tự mã hóa. Peptit tín hiệu lạ mã hóa trình tự có thể cần thiết trong đó trình tự mã hóa không chứa một cách tự nhiên trình tự mã hóa peptit tín hiệu. Tùy ý, peptit tín hiệu lạ mã hóa trình tự có thể thay thế đơn giản peptit tín hiệu tự

nhiên mã hóa trình tự để tăng cường sự bài tiết của polypeptit. Tuy nhiên, bất kỳ trình tự mã hóa peptit tín hiệu mà định hướng polypeptit được biểu hiện vào con đường kích thích bài tiết của tế bào chủ có thể được sử dụng.

Trình tự mã hóa peptit tín hiệu hiệu quả cho tế bào chủ vi khuẩn là trình tự mã hóa peptit tín hiệu thu được từ gen đối với *Bacillus* NCIB 11837 maltogenic amylaza, *Bacillus licheniformis* subtilisin, *Bacillus licheniformis* beta-lactamaza, *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylaza, proteaza trung tính *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), và *Bacillus subtilis* *prSA*. Peptit tín hiệu khác được mô tả bởi Simonen và Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

Trình tự mã hóa peptit tín hiệu hiệu quả cho tế bào chủ nấm dạng sợi là trình tự mã hóa peptit tín hiệu thu được từ gen đối với amylaza trung tính *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* glucoamylaza, *Aspergillus oryzae* TAKA amylaza, *Humicola insolens* xenlulaza, *Humicola insolens* endoglucanaza V, *Humicola lanuginosa* lipaza, và *Rhizomucor miehei* aspartic proteinaza.

Các peptit tín hiệu hiệu quả cho tế bào chủ nấm men thu được từ gen đối với yếu tố alpha *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces cerevisiae* invertaza. Các trình tự mã hóa peptit tín hiệu hữu dụng khác được mô tả bởi Romanos và cộng sự, 1992, *trước đây*.

Trình tự đối chứng có thể còn là tiền peptit mã hóa trình tự mà mã hóa tiền peptit nằm ở đầu N của polypeptit. Polypeptit tạo thành được gọi là tiền enzyme hoặc tiền polypeptit (hoặc tiền enzyme trong một số trường hợp). Tiền polypeptit thường bất hoạt và có thể chuyển thành polypeptit hoạt tính bằng cách phân cắt xúc tác hoặc tự xúc tác tiền peptit từ tiền polypeptit. Tiền peptit mã hóa trình tự có thể thu được từ gen đối với *Bacillus subtilis* alkaline proteaza (*aprE*), *Bacillus subtilis* neutral proteaza (*nprT*), *Myceliophthora thermophila* laccaza (WO 95/33836), *Rhizomucor miehei* aspartic proteinaza, và yếu tố alpha *Saccharomyces cerevisiae*.

Trong đó cả peptit tín hiệu và trình tự propeptit có mặt, trình tự propeptit được đặt cạnh đầu N của polypeptit và trình tự peptit tín hiệu được đặt cạnh đầu N của trình tự propeptit.

Có thể còn mong muốn để thêm trình tự điều biến mà điều biến biểu hiện của polypeptit so với sự phát triển của tế bào chủ. Các ví dụ của trình tự điều biến là các trình tự mà tạo ra biểu hiện gen được mở hoặc đóng đáp ứng kích thích hóa học hoặc vật lý, bao gồm sự có mặt của hợp chất điều biến bất kỳ. Trình tự điều biến trong hệ nhân sơ bao gồm hệ thao tác *lac*, *tac*, và *trp*. Trong nấm men, hệ ADH2 hoặc hệ GAL1 có thể được sử dụng. Trong nấm dạng sợi, vùng tăng cường *Aspergillus niger* glucoamylaza, vùng tăng cường *Aspergillus oryzae* TAKA alpha-amylaza, và vùng tăng cường *Aspergillus oryzae* glucoamylaza, vùng tăng cường *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza I, và vùng tăng cường *Trichoderma reesei* xylanbiohydrolaza II có thể được sử dụng. Các ví dụ khác của trình tự điều biến là các trình tự mà cho phép khuếch đại gen. Trong hệ nhân thực, trình tự điều biến này bao gồm gen dihydrofolatreductaza mà khuếch đại với sự có mặt của metotrexat, và gen metallothionein mà khuếch đại với kim loại nặng. Trong các trường hợp này, polynucleotit mã hóa polypeptit có thể liên kết hoạt động với trình tự điều biến.

#### Vector biểu hiện

Sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm polynucleotit theo sáng chế, vùng tăng cường, và tín hiệu kết thúc phiên mã và dịch mã. Các nucleotit khác nhau và trình tự đối chứng có thể được nối với nhau để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp mà có thể bao gồm một hoặc nhiều vị trí tới hạn thích hợp để cho phép chèn hoặc thế polynucleotit mã hóa polypeptit ở vị trí này. Tùy ý, polynucleotit có thể được biểu hiện bằng cách chèn polynucleotit hoặc cấu trúc axit nucleic bao gồm polynucleotit vào vector thích hợp để biểu hiện. Khi tạo ra vector biểu hiện, trình tự mã hóa được bố trí trong vector sao cho trình tự mã hóa liên kết hoạt động với trình tự đối chứng thích hợp để biểu hiện.

Vector biểu hiện tái tổ hợp có thể là bất kỳ vector (ví dụ, plasmit hoặc virus) mà trải qua một cách thích hợp quá trình ADN tái tổ hợp và có thể mang khoảng biểu hiện polynucleotit. Việc lựa chọn vector thường sẽ phụ thuộc vào khả năng tương hợp của vector với tế bào chủ mà vector được đưa vào. Vector có thể plasmit tuyến tính hoặc vòng kín.

Vector có thể là vector sao chép tự quản, tức là, vector mà tồn tại là thể ngoài nhiễm sắc thể, sao chép của nó mà độc lập với sao chép nhiễm sắc thể, ví dụ, plasmit, yếu tố ngoài nhiễm sắc thể, nhiễm sắc thể mini, hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo. Vector có thể bao gồm bất

kỳ phương tiện để đảm bảo tự sao chép. Tùy ý, vectơ có thể là vec tomà, khi được đưa vào tế bào chủ, được tích hợp vào bộ gen và sao chép cùng nhau với (các) nhiễm sắc thể mà nó được tích hợp vào đó. Ngoài ra, vectơ đơn hoặc plasmit hoặc hai hoặc nhiều vectơ hoặc plasmit mà cùng chứa tổng số ADN được đưa vào bộ gen của tế bào chủ, hoặc gen nhảy, có thể được sử dụng.

Tốt hơn là vectơ bao gồm một hoặc nhiều chất đánh dấu chọn lọc mà cho phép lựa chọn dễ dàng tế bào được biến nạp, chuyển nạp, tải nạp, hoặc tương tự. Chất đánh dấu chọn lọc là gen sản phẩm mà đề xuất sức kháng bioxit hoặc virut, sức kháng kim loại nặng, tính nguyên dưỡng đối với dinh dưỡng thụ động, và tương tự.

Các ví dụ của chất đánh dấu chọn lọc vi khuẩn là gen *Bacillus licheniformis* hoặc *Bacillus subtilis dal*, hoặc chất đánh dấu mà tạo ra sức kháng kháng sinh như ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, neomycin, spectinomycin, hoặc kháng tetracyclin. Chất đánh dấu thích hợp cho tế bào chủ nấm men bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, và URA3. Chất đánh dấu chọn lọc để dùng trong tế bào chủ nấm dạng sợi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *adeA* (phosphoribosylaminoimidazol-succinocarboxamid synthaza), *adeB* (phosphoribosylaminoimidazol synthaza), *amdS* (axetamidaza), *argB* (ornithin carbamoyltransferaza), *bar* (phosphinothrixin axetyltransferaza), *hph* (hygromycin phosphotransferaza), *niaD* (nitrat reductaza), *pyrG* (orotidin-5'-phosphat decarboxylaza), *sC* (sulfat adenyltransferaza), và *trpC* (anthranilat synthaza), cũng như tương đương của chúng. Được ưu tiên để dùng trong tế bào *Aspergillus* là gen *Aspergillus nidulans* hoặc *Aspergillus oryzae amdS* và *pyrG* và gen *Streptomyces hygroscopicus bar*. Được ưu tiên để dùng trong tế bào *Trichoderma* là gen *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph*, và *pyrG*.

Chất đánh dấu chọn lọc có thể là hệ chất đánh dấu chọn lọc kép như được mô tả trong WO 2010/039889. Theo một khía cạnh, chất đánh dấu chọn lọc kép là hệ chất đánh dấu chọn lọc kép *hph-tk*.

Vectơ tốt hơn là bao gồm (các) yếu tố mà cho phép tích hợp vectơ vào bộ gen của tế bào chủ hoặc sao chép tự quản của vectơ trong tế bào độc lập với bộ gen.

Để tích hợp vào bộ gen tế bào chủ, vector có thể nằm trên trình tự của polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc yếu tố bất kỳ khác của vector để tích hợp vào bộ gen bằng cách tái tổ hợp cùng loại hoặc khác loại. Tùy ý, vector có thể còn chứa polynucleotit để định hướng tích hợp bằng cách tái tổ hợp cùng loại vào bộ gen của tế bào chủ ở (các) vị trí chính xác trong (các) nhiễm sắc thể. Để làm tăng khả năng tích hợp ở vị trí chính xác, các yếu tố tích hợp cần chứa đủ số axit nucleic, như 100 đến 10,000 cặp bazơ, 400 đến 10,000 cặp bazơ, và 800 đến 10,000 cặp bazơ, mà có mức độ tương đồng trình tự cao với trình tự đích tương ứng để tăng cường khả năng của tái tổ hợp cùng loại. Các yếu tố tích hợp có thể là bất kỳ trình tự mà cùng loại với trình tự đích trong bộ gen của tế bào chủ. Ngoài ra, yếu tố tích hợp có thể là polynucleotit không mã hóa hoặc mã hóa. Mặt khác, vector có thể được tích hợp vào bộ gen của tế bào chủ bằng cách tái tổ hợp không cùng loại.

Để sao chép tự quản, vector có thể còn bao gồm gốc sao chép cho phép vector sao chép tự quản trong tế bào chủ yêu cầu. Gốc sao chép có thể là bất kỳ bản mẫu plasmit trung gian sao chép tự quản mà thực hiện chức năng trong tế bào. Thuật ngữ "gốc sao chép" hoặc "bản mẫu plasmit" nghĩa là polynucleotit mà cho phép plasmit hoặc vector sao chép *trông cơ thể*.

Các ví dụ của gốc sao chép vi khuẩn là gốc sao chép của plasmit pBR322, pUC19, pACYC177, và pACYC184 cho phép sao chép trong *E. coli*, và pUB110, pE194, pTA1060, và pAM $\beta$ 1 cho phép sao chép trong *Bacillus*.

Các ví dụ của gốc sao chép để dùng trong tế bào chủ nấm men là 2 micron gốc sao chép, ARS1, ARS4, kết hợp của ARS1 và CEN3, và kết hợp của ARS4 và CEN6.

Các ví dụ của gốc sao chép hữu dụng trong tế bào nấm dạng sợi là AMA1 và ANS1 (Gems và cộng sự, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen và cộng sự, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 9163-9175; WO 00/24883). Việc phân lập gen AMA1 và cấu trúc plasmit hoặc vector chứa gen có thể được thực hiện theo phương pháp được bộc lộ trong WO 00/24883.

Nhiều hơn một bản sao của polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn vào tế bào chủ để làm tăng sự tạo ra polypeptit. Tăng số lượng bản sao của polynucleotit có thể thu được bằng cách tích hợp ít nhất một bản sao bổ sung của trình tự vào bộ gen tế bào chủ



hoặc bằng cách bao gồm gen đánh dấu chọn lọc khuếch đại được với polynucleotit trong đó tế bào chứa bản sao khuếch đại của gen đánh dấu chọn lọc, và nhờ đó các bản sao bổ sung của polynucleotit, có thể được chọn bằng cách nuôi cấy tế bào với sự có mặt của chất lọc chọn thích hợp.

Quy trình dùng để buộc thắt các yếu tố được mô tả ở trên để cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Sambrook và cộng sự, 1989, trước đây).

### Tế bào chủ

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp, bao gồm polynucleotit theo sáng chế liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhắm đến việc sản xuất polypeptit theo sáng chế. Cấu trúc hoặc vector bao gồm polynucleotit được đưa vào tế bào chủ sao cho cấu trúc hoặc vector được duy trì là chất tích hợp nhiễm sắc thể hoặc là vector ngoài nhiễm sắc thể tự sao chép như mô tả trước đây. Thuật ngữ "tế bào chủ" bao gồm thể hệ con cái bất kỳ của tế bào bố mẹ mà không giống với tế bào bố mẹ do đột biến mà tạo ra sao trong quá trình chép. Việc lựa chọn tế bào chủ sẽ đến mức cao phụ thuộc vào gen mã hóa polypeptit và nguồn của nó.

Tế bào chủ có thể là tế bào bất kỳ hữu dụng trong việc sản xuất tái tổ hợp polypeptit theo sáng chế, ví dụ, nhân sơ hoặc nhân thực.

Tế bào chủ nhân sơ có thể là bất kỳ vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm. Vi khuẩn Gram dương bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, và *Streptomyces*. Vi khuẩn Gram âm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, và *Ureaplasma*.

Tế bào chủ vi khuẩn có thể là tế bào *Bacillus* bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus*

lentus, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, và *Bacillus thuringiensis*.

Tế bào chủ vi khuẩn có thể còn là bất kỳ tế bào *Streptococcus* bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, và *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

Tế bào chủ vi khuẩn có thể còn là bất kỳ tế bào *Streptomyces* bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, và *Streptomyces lividans*.

Việc đưa ADN vào tế bào *Bacillus* có thể bị tác động bởi biến nạp thể nguyên sinh (xem, ví dụ, Chang và Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115), biến nạp tế bào có khả năng (xem, ví dụ, Young và Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81: 823-829, hoặc Dubnau và Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56: 209-221), điện di (xem, ví dụ, Shigekawa và Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), hoặc liên hợp (xem, ví dụ, Koehler và Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278). Việc đưa ADN vào tế bào *E. coli* có thể bị tác động bởi biến nạp thể nguyên sinh (xem, ví dụ, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) hoặc điện di (xem, ví dụ, Dower và cộng sự, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). Việc đưa ADN vào tế bào *Streptomyces* bị tác động bởi biến nạp thể nguyên sinh, điện di (xem, ví dụ, Gong và cộng sự, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), liên hợp (xem, ví dụ, Mazodier và cộng sự, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585), hoặc tải nạp (xem, ví dụ, Burke và cộng sự, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). Việc đưa ADN vào tế bào *Pseudomonas* có thể bị tác động bằng điện di (xem, ví dụ, Choi và cộng sự, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) hoặc liên hợp (xem, ví dụ, Pinedo và Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). Việc đưa ADN vào tế bào *Streptococcus* có thể bị tác động bằng khả năng tự nhiên (xem, ví dụ, Perry và Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297), biến nạp thể nguyên sinh (xem, ví dụ, Catt và Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-207), điện di (xem, ví dụ, Buckley và cộng sự, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804), hoặc liên hợp (xem, ví dụ, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Tuy nhiên, phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để đưa ADN vào tế bào chủ có thể được sử dụng.

Tế bào chủ có thể còn là tế bào nhân thực, như tế bào của động vật có vú, côn trùng, cây, hoặc nấm.

Tế bào chủ có thể là tế bào nấm. "Nấm" như được sử dụng ở đây bao gồm phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, và Zygomycota cũng như Oomycota và tất cả nấm bất toàn (như xác định bởi Hawksworth và cộng sự, *In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, tái bản lần thứ 8, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

Tế bào chủ nấm có thể là tế bào chủ nấm men. "Nấm men" như được sử dụng ở đây bao gồm nấm men ascosporogenous (Endomycetales), nấm men basidiosporogenous, và nấm men thuộc Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Do việc phân loại nấm men có thể thay đổi trong tương lai, nhằm mục đích của sáng chế, nấm men có thể được xác định như được mô tả trong *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, Passmore, và Davenport, editors, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series* No. 9, 1980).

Tế bào chủ nấm men có thể là tế bào *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Yarrowia*, như *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, hoặc *Yarrowia lipolytica*.

Tế bào chủ nấm có thể là tế bào nấm dạng sợi. "Nấm dạng sợi" bao gồm tất cả các dạng sợi của phân họ Eumycota và Oomycota (như xác định bởi Hawksworth và cộng sự, 1995, *trước đây*). Nấm dạng sợi thường đặc trưng bởi thành hệ sợi gồm chitin, xenluloza, glucan, chitosan, mannan, và polysaccarit phức khác. Phát triển sinh dưỡng là bằng cách kéo dài sợi nấm và chuyển hóa cacbon là ưa khí bắt buộc. Ngược lại, phát triển sinh dưỡng bởi nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* là bằng cách tạo bọt tán đơn bào và chuyển hóa cacbon có thể là lên men.

Tế bào chủ nấm dạng sợi có thể là tế bào *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*,

*Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes, hoặc Trichoderma.*

*Ví dụ, tế bào chủ nấm dạng sợi có thể là tế bào Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, hoặc Trichoderma viride.*

Tế bào nấm có thể được biến nạp bằng quy trình liên quan đến hình thành thể nguyên sinh, biến nạp thể nguyên sinh, và tái sinh thành tế bào theo cách đã biết về bản chất. Các quy trình thích hợp để biến nạp tế bào chủ *Aspergillus* và *Trichoderma* được mô tả trong EP 238023, Yelton và cộng sự, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474, và Christensen và cộng sự, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Phương pháp thích hợp để biến nạp các loài *Fusarium* được mô tả bởi Malardier và cộng sự, 1989, *Gene* 78: 147-156, và WO 96/00787. Nấm men có thể được biến nạp sử dụng quy trình được mô tả bởi Becker và Guarente, In Abelson, J.N. và Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Tập 194, trang 182-187, Academic Press,

Inc., New York; Ito và cộng sự, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163; và Hinnen và cộng sự, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1920.

### Phương pháp sản xuất

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, bao gồm (a) nuôi cấy tế bào, mà ở dạng kiểu đại của nó tạo ra polypeptit, dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit; và tùy ý, (b) thu polypeptit.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, bao gồm (a) nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo sáng chế dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit; và tùy ý, (b) thu polypeptit.

Tế bào chủ được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thích hợp để sản xuất polypeptit sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, tế bào có thể được nuôi cấy bằng cách nuôi cấy bình thót cổ lắc, hoặc lên men quy mô nhỏ hoặc quy mô lớn (bao gồm lên men liên tục, từng mẻ, nạp mẻ, hoặc trạng thái rắn) trong lò lên men thí nghiệm hoặc công nghiệp trong môi trường thích hợp và dưới các điều kiện cho phép polypeptit biểu hiện và/hoặc phân lập. Nuôi cấy tiến hành trong môi trường dinh dưỡng thích hợp bao gồm các nguồn cacbon và nitơ và muối vô cơ, sử dụng quy trình đã biết trong lĩnh vực. Môi trường thích hợp được bán bởi các nhà cung cấp hoặc có thể được điều chế theo chế phẩm được công bố (ví dụ, trong catalogue của Ngân hàng giống tế bào của Mỹ). Nếu polypeptit được bài tiết vào môi trường dinh dưỡng, polypeptit có thể được tái tạo trực tiếp từ môi trường. Nếu polypeptit không được bài tiết, nó có thể được tái tạo từ hợp chất dung giải tế bào.

Polypeptit có thể được phát hiện sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực mà đặc hiệu đối với polypeptit. Phương pháp phát hiện này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc sử dụng kháng thể đặc hiệu, tạo thành sản phẩm enzym, hoặc biến mất nền enzym. Ví dụ, thử nghiệm enzym có thể được sử dụng để xác định hoạt tính của polypeptit.

Polypeptit có thể được thu hồi sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, polypeptit có thể được thu hồi từ môi trường dinh dưỡng bằng quy trình thông thường bao

gồm, nhưng không giới hạn ở, gom, ly tâm, lọc, chiết, phun sấy, làm bay hơi, hoặc kết tủa. Theo một khía cạnh, nước xuyết lên men bao gồm polypeptit được thu hồi.

Polypeptit có thể được tinh chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, kỵ nước, sắc ký tập trung, và cắt mô kích thước), quy trình điện di (ví dụ, điều tiêu đẳng điện điều chế), tính tan vi sai (ví dụ, kết tủa amoni sulfat), SDS-PAGE, hoặc chiết (xem, ví dụ, *Protein Purification*, Janson và Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) để cơ bản thu được polypeptit tinh khiết.

Theo khía cạnh tùy ý, polypeptit không được thu hồi, mà là tế bào chủ theo sáng chế biểu hiện polypeptit được dùng làm nguồn polypeptit.

#### Phối phẩm nước xuyết lên men hoặc Chế phẩm tế bào

Sáng chế còn đề cập đến phối phẩm nước xuyết lên men hoặc chế phẩm tế bào bao gồm polypeptit theo sáng chế. Sản phẩm nước xuyết lên men còn bao gồm thành phần bổ sung dùng trong quá trình lên men, như, ví dụ, tế bào (bao gồm, tế bào chủ chứa gen mã hóa polypeptit theo sáng chế mà dùng để tạo ra polypeptit có lợi), mảnh tế bào, sinh khối, môi trường lên men và/hoặc sản phẩm lên men. Theo một số phương án, chế phẩm là nước xuyết tổng thể diệt tế bào chứa (các) axit hữu cơ, tế bào chết và/hoặc mảnh tế bào, và môi trường nuôi cấy.

Thuật ngữ "nước xuyết lên men" như được sử dụng ở đây đề cập đến chế phẩm được tạo ra bằng cách lên men tế bào mà đi qua tái sinh và/hoặc tinh chế tối thiểu hoặc không có. Ví dụ, nước xuyết lên men được tạo ra khi nuôi cấy vi khuẩn được nuôi lớn đến bão hòa, được ủ dưới các điều kiện giới hạn cacbon để cho phép tổng hợp protein (ví dụ, biểu hiện của enzym bằng tế bào chủ) và bài tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào. Nước xuyết lên men có thể chứa hàm lượng phân đoạn hoặc không phân đoạn của vật liệu lên men dẫn xuất ra vào cuối quá trình lên men. Thông thường, nước xuyết lên men không được phân đoạn và bao gồm spent môi trường nuôi cấy đã dùng và mảnh tế bào có mặt sau khi loại tế bào vi khuẩn (ví dụ, tế bào nấm dạng sợi), ví dụ, bằng cách ly tâm. Theo một số phương án, nước

xuýt lên men bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào đã dùng, enzym ngoại bào, và tế bào vi khuẩn sống được và/hoặc không sống được.

Theo một khía cạnh, phối phẩm nước xuýt lên men và chế phẩm tế bào bao gồm thành phần axit hữu cơ thứ nhất bao gồm ít nhất một 1-5 cacbon axit hữu cơ và/hoặc muối của chúng và thành phần axit hữu cơ thứ hai bao gồm ít nhất một 6 hoặc nhiều cacbon axit hữu cơ và/hoặc muối của chúng. Theo phương án cụ thể, thành phần axit hữu cơ thứ nhất là axit axetic, axit formic, axit propionic, muối của chúng, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất trên và thành phần axit hữu cơ thứ hai là axit benzoic, axit xyclohexanecarboxylic, axit 4-metylvaleric, axit phenylaxetic, muối của chúng, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất trên.

Theo một khía cạnh, chế phẩm bao gồm (các) axit hữu cơ, và tùy ý còn bao gồm tế bào chết và/hoặc mảnh tế bào. Theo một phương án, tế bào chết và/hoặc mảnh tế bào được loại bỏ khỏi nước xuýt tổng thể diệt tế bào để tạo ra chế phẩm mà không có các thành phần này.

Phối phẩm nước xuýt lên men hoặc chế phẩm tế bào có thể còn bao gồm chất bảo quản và/hoặc chất chống vi khuẩn (ví dụ, kìm hãm vi khuẩn), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sorbitol, natri clorua, natri sorbat, và các chất khác đã biết trong lĩnh vực.

Nước xuýt tổng thể hoặc chế phẩm diệt tế bào có thể bao gồm hàm lượng không phân đoạn của vật liệu lên men xuất ra vào cuối quá trình lên men. Thông thường, nước xuýt tổng thể hoặc chế phẩm diệt tế bào bao gồm môi trường nuôi cấy đã dùng và mảnh tế bào có mặt sau khi tế bào vi khuẩn (ví dụ, tế bào nấm dạng sợi) lớn đến bão hòa, được ủ dưới các điều kiện giới hạn cacbon để cho phép tổng hợp protein. Theo một số phương án, nước xuýt tổng thể hoặc chế phẩm diệt tế bào bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào đã dùng, enzym ngoại bào, và tế bào nấm dạng sợi chết. Theo một số phương án, tế bào vi khuẩn có mặt trong nước xuýt tổng thể hoặc chế phẩm diệt tế bào có thể được thấm và/hoặc dung giải sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Nước xuýt tổng thể hoặc chế phẩm tế bào như được mô tả ở đây thường là dịch lỏng, nhưng có thể bao gồm thành phần không tan, như tế bào bị chết, mảnh tế bào, thành

phần của môi trường nuôi cấy, và/hoặc (các) enzym không tan. Theo một số phương án, thành phần không tan có thể được loại bỏ để tạo ra chế phẩm lỏng được làm trong.

Phối phẩm nước xuýt tổng thể và chế phẩm tế bào theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong WO 90/15861 hoặc WO 2010/096673.

### Chế phẩm Enzym

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm bao gồm polypeptit theo sáng chế. Tốt hơn là, chế phẩm được làm giàu trong polypeptit này. Thuật ngữ "được làm giàu" chỉ ra rằng hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza của chế phẩm tăng, *ví dụ*, với yếu tố làm giàu bằng ít nhất 1,1.

Chế phẩm có thể bao gồm polypeptit theo sáng chế là thành phần enzym chính, *ví dụ*, chế phẩm một thành phần. Tùy ý, chế phẩm có thể bao gồm nhiều hoạt tính enzym, như một hoặc nhiều (*ví dụ*, một vài) enzym được chọn từ nhóm bao gồm hydrolaza, isomeraza, ligaza, lyaza, oxidoreductaza, hoặc transferaza, *ví dụ*, alpha-galactosidaza, alpha-glucosidaza, aminopeptidaza, amylaza, beta-galactosidaza, beta-glucosidaza, beta-xylosidaza, carbohydrazaza, carboxypeptidaza, catalaza, xenlobiohydrolaza, xenlulaza, chitinaza, cutinaza, xyclodextrin glycosyltransferaza, deoxyribonucleaza, endoglucanaza, esteraza, glucoamylaza, invertaza, laccaza, lipaza, mannosidaza, mutanaza, oxidaza, enzym pectinolytic, peroxidaza, phytaza, polyphenoloxidaza, enzym phân giải protein, ribonucleaza, transglutaminaza, hoặc xylanaza.

Chế phẩm có thể được điều chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực và có thể là dưới dạng dịch lỏng hoặc chế phẩm khô. Chế phẩm có thể được làm ổn định theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Các ví dụ được đưa ra dưới đây về việc sử dụng ưu tiên chế phẩm theo sáng chế. Liều dùng của chế phẩm và các điều kiện khác mà chế phẩm được dùng có thể được xác định trên cơ sở phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

### Sử dụng



Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng polypeptit theo sáng chế trong việc chiết cà phê.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. thêm vào hạt cà phê này nước và polypeptit theo sáng chế có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza;
- c. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
- d. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất.

Các phương án

Sáng chế còn được xác định trong các đoạn sau đây:

1. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:
  - a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
  - c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
  - d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
  - e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là chịu nhiệt được.
2. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:
  - a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;

c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;

d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và

e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 18.

3. Phương pháp theo đoạn 2, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 18.

4. Phương pháp theo đoạn 3, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 3.

5. Phương pháp theo đoạn 3, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 18.

6. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 3-5, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là chịu nhiệt được.

7. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 1 hoặc 6, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất 80°C, tốt hơn là ít nhất 85°C hoặc ít nhất 90°C.

8. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 1 hoặc 6-7, trong đó việc ủ trong bước d. được thực hiện ở nhiệt độ bằng ít nhất 60°C như ít nhất 65°C, tốt hơn là ít nhất 70°C như ít nhất 75°C hoặc ít nhất 80°C.

9. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 1 hoặc 6-8, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện trong ít nhất một giờ, tốt hơn là trong ít nhất 2 giờ hoặc ít nhất 4 giờ.

10. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 1 hoặc 6-9, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện trong 1-48 giờ, tốt hơn là trong 2-24 giờ hoặc 4-24 giờ.

11. Phương pháp theo đoạn 2, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 13.

12. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn trên, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là endo-beta-1,4-mananaza.

13. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn trên, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là GH5 endo-beta-1,4-mananaza, tốt hơn là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza hoặc GH5\_8 endo-beta-1,4-mananaza.

14. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn trên, trong đó hạt cà phê rang và xay được đưa qua bước chiết thứ nhất trước bước c.

15. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn trên, trong đó hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết trước bước c.

16. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 14-15, trong đó nỗ hời nước được thực hiện sau một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất (bước b) và trước bước c.

17. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 14-16, trong đó bước nghiền thứ hai hạt cà phê được thực hiện sau một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất (bước b) và trước bước c.

18. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn trên, trong đó chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm ít nhất 100% chất khô hơn so với chiết xuất cà phê được điều chế bằng phương pháp tương tự mà không bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

19. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn 14-18, trong đó ít nhất 8% theo khối lượng của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e.

20. Polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; và

(b) polypeptit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

21. Polypeptit theo đoạn 20, mà là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza.

22. Polypeptit theo đoạn 20 hoặc 21, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; và

(b) polypeptit có ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

23. Polypeptit theo đoạn 20 hoặc 21, được chọn từ nhóm bao gồm

(a) polypeptit khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; và

(b) polypeptit khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

24. Polypeptit theo đoạn 20 hoặc 21, được chọn từ nhóm bao gồm
  - (a) polypeptit khác biệt đến 5 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4 hoặc 5, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; và
  - (b) polypeptit khác biệt đến 5 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4 hoặc 5, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.
25. Polypeptit theo đoạn 20, bao gồm hoặc gồm có:
  - (a) Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8; hoặc
  - (b) Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.
26. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-25, mà là polypeptit được phân lập.
27. Chế phẩm bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26.
28. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26 để xử lý cà phê.
29. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26 để xử lý hạt cà phê rang và xay.
30. Việc sử dụng theo đoạn 29, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.
31. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:
  - a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. thêm vào hạt cà phê này nước và polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26;
  - c. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và

- d. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất.
32. Phương pháp theo đoạn 31, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.
33. Polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26.
34. Cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo đoạn 33 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhắm đến việc sản xuất polypeptit trong vật chủ biểu hiện.
35. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm polynucleotit theo đoạn 33 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhắm đến việc sản xuất polypeptit.
36. Phương pháp sản xuất polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26, bao gồm nuôi cấy tế bào, mà ở dạng kiểu đại của nó tạo ra polypeptit, dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
37. Phương pháp theo đoạn 36, còn bao gồm thu polypeptit.
38. Phương pháp sản xuất polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo đoạn 35 dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
39. Phương pháp theo đoạn 38, còn bao gồm thu polypeptit.
40. Phối phẩm cạnh thang tất cả hoặc chế phẩm nuôi cấy tế bào bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 20-26.
41. Polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza, được chọn từ nhóm bao gồm:
  - (a) polypeptit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii);

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 90% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự cADN của chúng;

(d) biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí; và

(e) đoạn của polypeptit nêu ở (a), (b), (c), hoặc (d) mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

42. Polypeptit theo đoạn 41, mà là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza.

43. Polypeptit theo đoạn 41 hoặc 42, có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8.

44. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-43 khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8.

45. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-44, mà được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii).

46. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-45, mà được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự cADN của chúng.

47. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-46, bao gồm hoặc chứa Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8.

48. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-46, mà là biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí.

49. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-46, mà là đoạn nêu ở SEQ ID NO: 8, trong đó đoạn có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

50. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-49, mà thu được từ *Chaetomium*.

51. Polypeptit theo đoạn 50, mà thu được từ *Chaetomium virescens*.

52. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51, mà là polypeptit được phân lập.

53. Chế phẩm bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51.

54. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51 để xử lý cà phê.

55. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51 để xử lý hạt cà phê rang và xay.

56. Việc sử dụng theo đoạn 55, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.

57. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. thêm vào hạt cà phê này nước và polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51;
- c. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và



- d. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất.
58. Phương pháp theo đoạn 57, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.
59. Polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51.
60. Cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo đoạn 59 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhằm đến việc sản xuất polypeptit trong vật chủ biểu hiện.
61. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm polynucleotit theo đoạn 59 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhằm đến việc sản xuất polypeptit.
62. Phương pháp sản xuất polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51, bao gồm nuôi cấy tế bào, mà ở dạng kiểu đại của nó tạo ra polypeptit, dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
63. Phương pháp theo đoạn 62, còn bao gồm thu polypeptit.
64. Phương pháp sản xuất polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo đoạn 61 dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
65. Phương pháp theo đoạn 64, còn bao gồm thu polypeptit.
66. Polynucleotit phân lập mã hóa peptit tín hiệu bao gồm hoặc chứa axit amin 1 đến 17 nêu ở SEQ ID NO: 7.
67. Phối phẩm cạnh thang tất cả hoặc chế phẩm nuôi cấy tế bào bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 41-51.
68. Polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mannanaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) polypeptit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii);

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 80% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự cADN của chúng;

(d) biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí; và

(e) đoạn của polypeptit của (a), (b), (c), hoặc (d) mà có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

69. Polypeptit theo đoạn 68, mà là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza.

70. Polypeptit theo đoạn 68 hoặc 69, có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

71. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-70 khác biệt đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10, so với polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

72. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-71, mà được mã hóa bởi polynucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt thấp-trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình-cao, các điều kiện nghiêm ngặt cao, hoặc các điều kiện nghiêm ngặt rất cao với (i) polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11, (ii) trình tự cADN của chúng, hoặc (iii) phần bổ sung chiều dài đầy đủ nêu ở (i) hoặc (ii).

73. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-72, mà được mã hóa bởi polynucleotit có ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với polypeptit chín muối mã hóa trình tự nêu ở SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự cADN của chúng.

74. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-73, bao gồm hoặc chứa Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13.

75. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-73, mà là biến thể của polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 bao gồm thể, loại, và/hoặc chèn ở một hoặc nhiều vị trí.

76. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-74, mà là đoạn nêu ở SEQ ID NO: 13, trong đó đoạn có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza.

77. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-76, mà thu được từ *Sordaria*.

78. Polypeptit theo đoạn 77, mà thu được từ *Sordaria macrospora*.

79. Polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78, mà là polypeptit được phân lập.

80. Chế phẩm bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78.

81. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78 để xử lý cà phê.

82. Việc sử dụng polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78 để xử lý hạt cà phê rang và xay.

83. Việc sử dụng theo đoạn 82, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.

84. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. thêm vào hạt cà phê này nước và polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78;
  - c. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
  - d. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất.
85. Phương pháp theo đoạn 84, trong đó hạt cà phê rang và xay được chiết một phần.
86. Polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78.
87. Cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo đoạn 86 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhắm đến việc sản xuất polypeptit trong vật chủ biểu hiện.
88. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm polynucleotit theo đoạn 86 liên kết hoạt động với một hoặc nhiều trình tự đối chứng mà nhắm đến việc sản xuất polypeptit.
89. Phương pháp sản xuất polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78, bao gồm nuôi cấy tế bào, mà ở dạng kiểu đại của nó tạo ra polypeptit, dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
90. Phương pháp theo đoạn 89, còn bao gồm thu polypeptit.
91. Phương pháp sản xuất polypeptit có hoạt tính endo-beta-1,4-mananaza, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo đoạn 88 dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất polypeptit.
92. Phương pháp theo đoạn 91, còn bao gồm thu polypeptit.
93. Polynucleotit phân lập mã hóa peptit tín hiệu bao gồm hoặc chứa axit amin 1 đến 17 nêu ở SEQ ID NO: 12.

94. Phôi phẩm cạnh thang tất cả hoặc chế phẩm nuôi cấy tế bào bao gồm polypeptit theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 68-78.

95. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 1-19 trong đó enzym có hoạt tính mananaza bao gồm vùng liên kết CBM1.

96. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
- b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
- c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
- d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
- e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,

trong đó enzym có hoạt tính mananaza bao gồm vùng liên kết CBM1.

97. Phương pháp theo đoạn 96 trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 19.

98. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-97, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 19.

99. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-98, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%,

ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 3.

100. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-98, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 60% tương đồng trình tự, tốt hơn là ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự, với SEQ ID NO: 19.

101. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-100, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là chịu nhiệt được.

102. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-101, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất 80°C, tốt hơn là ít nhất 85°C hoặc ít nhất 90°C.

103. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-102, trong đó việc ủ trong bước d. được thực hiện ở nhiệt độ bằng ít nhất 60°C như ít nhất 65°C, tốt hơn là ít nhất 70°C như ít nhất 75°C hoặc ít nhất 80°C.

104. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-103, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện trong ít nhất một giờ, tốt hơn là trong ít nhất 2 giờ hoặc ít nhất 4 giờ.

105. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-104, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện trong 1-48 giờ, tốt hơn là trong 2-24 giờ hoặc 4-24 giờ.

106. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-105, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là endo-beta-1,4-mananaza.

107. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-106, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là GH5 endo-beta-1,4-mananaza, tốt hơn là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza hoặc GH5\_8 endo-beta-1,4-mananaza.

108. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-107, trong đó hạt cà phê rang và xay được đưa qua bước chiết thứ nhất trước bước c.

109. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-108, trong đó hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết trước bước c.

110. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 108-109, trong đó nỗ hơi nước được thực hiện sau một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất (bước b) và trước bước c.

111. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 108-110, trong đó bước nghiền thứ hai hạt cà phê được thực hiện sau một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất (bước b) và trước bước c.

112. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 96-111, trong đó chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm ít nhất 100% chất khô hơn so với chiết xuất cà phê được điều chế bằng phương pháp tương tự mà không bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

113. Phương pháp theo bất kỳ trong số các đoạn 96-112, trong đó ít nhất 8% theo khối lượng của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Enzym

Trong các ví dụ dưới đây các enzym sau đây được sử dụng:

| SEQ ID<br>NO: | Ví dụ   | Mô tả                       | Nguồn gốc                      | GH  |
|---------------|---------|-----------------------------|--------------------------------|-----|
| 1-3           | Ví dụ 1 | Endo- $\beta$ -1,4-mananaza | <i>Talaromyces leycettanus</i> | GH5 |
| 6-8           | Ví dụ 2 | Endo- $\beta$ -1,4-mananaza | <i>Chaetomium virescens</i>    | GH5 |
| 11-13         | Ví dụ 3 | Endo- $\beta$ -1,4-mananaza | <i>Sordaria macrospora</i>     | GH5 |

#### Nguyên liệu

Các chất hóa học được sử dụng làm đệm và nền là các sản phẩm bán trên thị trường bằng ít nhất cấp phản ứng.

#### Môi trường và Dung dịch

YP+2% môi trường glucoza gồm có 1% chiết xuất nấm men, 2% pepton và 2% glucoza.

Các tấm aga PDA gồm có nước sắc khoai tây (nước sắc khoai tây được tạo ra bằng cách đun sôi 300 g khoai tây cắt lát (rửa nhưng không gọt vỏ) trong nước trong 30 phút và sau đó lắng gạn hoặc lọc nước xuýt qua vải thưa. Nước chung cất sau đó được thêm đến khi tổng thể tích huyền phù là một lít, sau đó 20 g dextroza và 20 g bột aga. Môi trường được vô trùng bằng cách hấp khử trùng ở 15 psi trong 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, tái bản lần thứ 8, Sửa đổi A, 1998).

Tấm LB gồm có 10 g Bacto-Trypton, 5 g chiết xuất nấm men, 10 g natri clorua, 15 g Bacto-aga, và nước khử ion đến 1 lít. Môi trường được vô trùng bằng cách hấp khử trùng ở 15 psi trong 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, tái bản lần thứ 8, Sửa đổi A, 1998).

Các tấm sucroza COVE gồm có 342 g Sucroza (Sigma S-9378), 20 g Bột aga, 20 ml Dung dịch muối Cove (26 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 26 g KCL, 26 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 ml Dung dịch kim loại vết Cove) và nước khử ion đến 1 lít), và nước khử ion đến 1 lít). Môi trường được vô trùng bằng cách hấp khử trùng ở 15 psi trong 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, tái bản lần thứ 8, Sửa đổi A, 1998). Môi trường được làm nguội đến 60°C và được thêm 10 mM axetamit, 15 mM CsCl, Triton X-100 (50  $\mu\text{l}$ /500 ml)).

Dung dịch kim loại vết Cove gồm có 0,04 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,7 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , và nước khử ion đến 1 lít.

Ví dụ 1: Tách dòng, biểu hiện và tinh chế chủng *Talaromyces leycettanus* endo-mananaza (MANANAZA 1)

#### Strains



Chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 được dùng làm nguồn polypeptit có hoạt tính mananaza. Chủng *Aspergillus oryzae* MT3568 được dùng để biểu hiện của gen *Talaromyces leycettanus* mã hóa polypeptit có hoạt tính mananaza. *A. oryzae* MT3568 là gen đứt đoạn *amdS* (axetamidaza) có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 02/40694) trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động *pyrG* được phục hồi bằng cách làm đứt đoạn gen *A. oryzae* axetamidaza (*amdS*).

Nguồn thông tin trình tự ADN cho chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68

Thông tin trình tự bộ gen được tạo ra bằng cách sắp trình tự ADN Illumina ở Viện Bộ gen Bắc Kinh (the Beijing Genome Institute - BGI) ở Bắc Kinh, Trung Quốc, từ ADN bộ gen được phân lập từ chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68. Việc lắp ghép ban đầu của bộ gen được phân tích sử dụng Bộ phân tích trình tự Pedant-Pro™ (Biomax Informatics AG, Martinsried, Đức). Mô hình gen được cấu trúc bởi phần mềm được dùng làm điểm khởi đầu để phát hiện chất tương tự GH5 trong bộ gen. Mô hình gen chính xác hơn được cấu trúc thủ công sử dụng nhiều trình tự protein GH5 đã biết làm trình tự dẫn.

Việc chiết ADN bộ gen của chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68

Để tạo ra ADN bộ gen để khuếch đại PCR, chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 được nhân giống trên các tấm aga PDA bằng cách nuôi ở 26°C trong 7 ngày. Bào tử thu hoạch được từ các tấm PDA được dùng để chủng ngừa 25 ml YP+2% môi trường glucoza trong bình thót cổ rung được chắn và ủ ở 26°C trong 72 giờ kèm khuấy ở 85 rpm.

ADN bộ gen được phân lập theo phương pháp bộ kit DNeasy Plant Maxi cải biến (Qiagen Danmark, Copenhagen, Đan Mạch). Vật liệu nấm từ nuôi cấy trên được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 14,000 x g trong 2 phút. Dịch nổi được loại ra và 0,5 g viên nhỏ được đông lạnh trong nitơ lỏng với cát thạch anh và được nghiền thành bột mịn cối làm lạnh trước. Bột được chuyển vào ống ly tâm 15 ml và được thêm 5 ml đệm AP1 (gia nhiệt trước đến 65 °C) và 10 µl dung dịch gốc RNaza A (100 mg/ml) sau đó tạo xoáy mạnh. Sau khi ủ trong 10 phút ở 65 °C kèm đảo đều ống, 1,8 ml đệm AP2 được thêm vào sản phẩm phân giải bằng cách trộn nhẹ nhàng sau đó ủ trên đá lạnh trong 10 phút. Sản phẩm phân giải sau

đó được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và dịch nổi được lắng gạn vào cột quay QIAshredder Maxi đặt trong ống gom 50 ml. Sau đó ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Chất chảy qua được chuyển vào ống 50 ml mới và được thêm 1,5 thể tích của đệm AP3/E sau đó tạo xoáy. 15 ml mẫu được chuyển vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Chất chảy qua được bỏ đi và 12 ml đệm AW được thêm vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi bỏ đi chất chảy qua, lặp lại ly tâm để loại bỏ rượu còn lại. Cột quay DNeasy Maxi được chuyển đến ống 50 ml mới và 0,5 ml đệm AE (gia nhiệt trước đến 70°C) được thêm. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, mẫu được tách rửa bằng ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Lặp lại tách rửa với 0,5 ml đệm AE bổ sung và nước giải hấp được gom. Nồng độ của ADN thu hoạch được đo bằng phổ quang kế UV ở 260 nm.

Việc cấu trúc vector biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự bộ gen của chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 mã hóa họ GH5 polypeptit có hoạt tính mananaza

Hai đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp được thể hiện dưới đây được thiết kế để phóng đại PCR gen P23YST của chủng *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 (SEQ ID NO: 1) từ ADN bộ gen được điều chế như được mô tả ở trên. Bộ kit tách dòng IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) được sử dụng để tách dòng đoạn trực tiếp vào vector biểu hiện pDau109 (WO 2005/042735).

F-P23YST

5'-acacaactgggatccaccATGAAGTTGTCTACCCTCAATTCCT-3' (SEQ ID NO: 4)

R-P23YST

5'-ccctctagatctcgagCACGTCAGTATCAGCGAAGCAT-3' (SEQ ID NO: 5)

Chữ in hoa thể hiện trình tự gen. Trình tự gạch chân là tương đồng với vị trí chèn vào của pDau109.

Máy MJ Research PTC-200 ADN được dùng để thực hiện phản ứng PCR. Bộ kit PCR độ tin cậy cao Phusion® (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan) được dùng để khuếch đại PCR. Phản ứng PCR gồm có 5 µl đệm HF 5X (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Phusion® ADN polymeraza (0,2 đơn vị/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 2 µl đoạn mồi F-P23YST (2,5 µM), 2 µl đoạn mồi R-P23YST (2,5 µM), 0,5 µl *Talaromyces leycettanus* ADN bộ gen (100 ng/µl), và 14,5 µl nước khử ion trong tổng thể tích bằng 25 µl. Các điều kiện PCR là 1 vòng ở 95°C trong 2 phút. Mỗi 35 vòng ở 98°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây, và 72°C trong 2 phút; và 1 vòng ở 72°C trong 10 phút. Sau đó mẫu được giữ ở 12°C đến khi loại ra khỏi máy PCR.

Sản phẩm phản ứng được phân lập bằng 1,0% điện di agarosa gel sử dụng 40 mM Tris bazo, 20 mM natriacetat, 1 mM đệm dinatri EDTA (TAE) trong đó dải sản phẩm 1613 bp được cắt mô từ gel và được tinh chế sử dụng bộ kit tinh chế GFX® PCR ADN và dải gel minh họa (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Đan Mạch) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó đoạn được tách dòng vào *Bam* HI và *Xho* I tự hoại pDau109 sử dụng bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra plasmit pP23YST. Việc tách dòng của gen P23YST vào *Bam* HI-*Xho* I tự hoại pDau109 tạo ra phiên mã của gen *Talaromyces leycettanus* P23YST dưới kiểm soát của vùng khởi động kép NA2-tpi. NA2-tpi là vùng khởi động được biến đổi từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger* trong đó vùng dẫn đầu không dịch mã được thay bằng vùng dẫn đầu không dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphatisomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Phương pháp tách dòng được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra cấu trúc P23YST GH5. Plasmit không được xử lý và chèn được biến nạp vào tế bào *E. coli* có khả năng hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được đặt lên tấm LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, các cụm được thấy là phát triển dưới sự chọn lọc trên các tấm LB ampicillin. Hai cụm được biến nạp với cấu trúc P23YST GH5 được cấy trong môi trường LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml và plasmit được phân lập với bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các plasmid được phân lập được sắp trình tự với đoạn mỗi vectơ và đoạn mỗi đặc hiệu gen P23YST để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmid đại diện mà không có lỗi PCR.

Mô tả đặc tính của trình tự bộ gen *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 mã hóa polypeptit P23YST GH5 có hoạt tính mananaza

Việc sắp trình tự ADN của dòng vô tính bộ gen P23YST của *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 được thực hiện với thiết bị sắp trình tự ADN tự động hóa Model 3700 hệ sinh học áp dụng sử dụng hóa học kết thúc BIG-DYE™ phiên bản 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) và chiến lược đi trên đoạn môi. Dữ liệu của trình tự nucleotit được nghiên cứu về chất lượng và tất cả trình tự được so sánh với nhau với sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (Đại học Washington, Seattle, WA, USA).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P23YST của *Talaromyces leycettanus* được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, tương ứng. Trình tự mã hóa là 1548 bp bao gồm bộ ba mã hóa chặn và bị ngắt quãng bởi ba intron. Protein dự báo được mã hóa là 431 axit amin. Sử dụng chương trình SignalP (Nielsen và cộng sự, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu của 17 gốc được dự báo. Protein chín muối được dự báo (SEQ ID NO: 3) bao gồm 414 axit amin với phân tử khối dự báo bằng 45 kDa và pH đẳng điện bằng 4,8. Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 3 thể hiện hoạt tính mananaza như thể hiện dưới đây.

Việc sắp thẳng hàng tất cả từng cặp so sánh của trình tự axit amin được xác định sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) với điểm phạt mở quãng cách bằng 10, điểm phạt kéo dài quãng cách bằng 0,5, và ma trận EBLOSUM62. Thuật toán thể hiện rằng trình tự axit amin suy ra của gen *Talaromyces leycettanus* mã hóa polypeptit P23YST GH5 có hoạt tính mananaza có chung 71% tương đồng (không bao gồm khe) với trình tự axit amin suy ra của protein họ GH5 dự báo từ *Talaromyces stipitatus* (số truy cập SWISSPROT:B8M6W7) với hoạt tính endo mananaza.

Biểu hiện của *Talaromyces leycettanus* GH5 mananaza (MANANAZA 1)

Plasmid pP23YST biểu hiện được biến nạp vào *Aspergillus oryzae* MT3568. *Aspergillus oryzae* MT3568 là AMDS (axetamidaza) bị đứt đoạn có nguồn gốc từ JaL355 (WO 02/40694) trong đó pyrG auxotrophy được phục hồi trong quá trình đánh bại gen *Aspergillus oryzae* axetamidaza (AMDS). Thể nguyên sinh MT3568 được điều chế theo phương pháp của Sáng chế Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Chất biến nạp được tinh chế trên tấm lựa chọn sucroza COVE qua hạt dính đơn trước khi hình thành bào tử chủng trên tấm PDA. Việc sản xuất polypeptit *Talaromyces leycettanus* GH5 bằng chất biến nạp được phân tích từ dịch nổi nuôi cấy của 1 ml 96 nuôi cấy tại giếng sâu ở 30°C trong môi trường YP+2% glucoza. Biểu hiện được kiểm tra trên gel 48 giếng E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bằng cách nhuộm màu Coomassie. Một chất biến nạp được chọn để gia công thêm và thiết kế *Aspergillus oryzae* 11.7.

Đối với sản xuất quy mô lớn hơn, bào tử *Aspergillus oryzae* 11.7 được rải lên tấm PDA và được ủ trong năm ngày ở 37°C. Tấm bào tử hợp lưu được rửa hai lần với 5 ml 0,01% TWEEN® 20 để tối đa hóa số lượng bào tử được gom. Huyền phù bào tử sau đó được dùng để chủng ngừa mười lăm bình thốt cổ 500 ml chứa 150 ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Nuôi cấy được ủ ở 30°C kèm lắc cố định ở 100 rpm. Vào ngày bốn sau khi chủng ngừa, nước xuyết nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua thiết bị lọc MF75 Supor MachV 0,2 µm PES nắp chai (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Nước xuyết nuôi cấy mới từ chất biến nạp này tạo ra dải protein GH5 bằng xấp xỉ 42 kDa. Nhận diện của dải nổi bật là polypeptit *Talaromyces leycettanus* GH5 được kiểm tra bằng cách sắp trình tự peptit.

Phương pháp khác sản xuất GH5 mananaza của *Talaromyces leycettanus* (MANANAZA 1)

Trên cơ sở trình tự nucleotit được xác định là SEQ ID NO: 1, gen tổng hợp có thể thu được từ nhiều nhà cung cấp như Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Đức) hoặc DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA). Gen tổng hợp có thể được thiết kế để kết hợp trình tự ADN

bổ sung như vị trí tới hạn hoặc vùng tái tổ hợp tương đồng để tạo điều kiện cho việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Sử dụng hai đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp F-P23YST và R-P23YST được mô tả ở trên, phản ứng PCR đơn có thể được dùng để khuếch đại khung đọc mở chiều dài đầy đủ từ gen tổng hợp nêu ở SEQ ID NO: 1. Gen sau đó có thể được tách dòng vào vector biểu hiện ví dụ như được mô tả ở trên và được biểu hiện ở tế bào chủ, ví dụ ở *Aspergillus oryzae* như được mô tả ở trên.

#### Tinh chế GH5 mananaza của *Talaromyces leycettanus* (MANANAZA 1)

Nước xuất đã lọc được điều chỉnh đến pH7,0 và được lọc trên thiết bị lọc PES 0,22µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware cat#595-4520). Sau đó, phần lọc được thêm 1,8M amoni sulphat. Phần lọc được tải lên cột chảy nhanh 6 Phenyl Sepharose™ (sub cao) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng với 1,8M amoni sulphat, 25mM HEPES pH7,0. Sau khi rửa với 1,0M amoni sulphat, các protein liên kết được tách rửa cả mẻ với 25 mM HEPES pH 7,0. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE. Các đoạn được trộn và được áp dụng lên cột Sephadex™ G-25 (môi trường) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 25 mM HEPES pH 7,5. Các đoạn được áp dụng cho cột SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 25 mM HEPES pH 7,5 và các protein liên kết được tách rửa với gradien tuyến tính từ 0-1000 mM natri clorua qua 20CV. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE.

Ví dụ 2. Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo-mananaza của *Chaetomium virescens* (MANANAZA 2)

#### Chủng

*Chaetomium virescens* CBS547.75 được dùng làm nguồn polypeptit có hoạt tính mananaza. Chủng *Aspergillus oryzae* MT3568 được dùng để biểu hiện gen *Chaetomium virescens* mã hóa polypeptit có hoạt tính mananaza. *A. oryzae* MT3568 là gen *amdS* (axetamidaza) bị đứt đoạn có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694)

trong đó *pyrG* auxotrophy được phục hồi bằng cách làm đứt đoạn gen *A. oryzae* *axetamidaza* (*amdS*).

Nguồn thông tin trình tự ADN đối với chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75

Thông tin trình tự bộ gen được tạo ra bằng cách sắp trình tự mô phỏng ADN ở The National Center for Genome Resources ở Santa Fe, Mexico mới từ ADN bộ gen được phân lập từ chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75. Lắp ghép cơ bản của bộ gen được phân tích sử dụng thiết bị ghép trình tự Abyss 1.2.0 (GSC Software Center, Vancouver, Canada). Mô hình gen được cấu trúc bằng phần mềm được sử dụng làm điểm khởi đầu để phát hiện chất tương tự GH5 trong bộ gen. Mô hình gen chính xác hơn được cấu trúc bằng tay sử dụng nheiefu trình tự protein GH5 đã biết làm trình tự dẫn.

Việc chiết ADN bộ gen của chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75

Để tạo ra ADN bộ gen để khuếch đại PCR, chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75 được nhân giống trên tấm aga PDA bằng cách nuôi ở 26°C trong 7 ngày. Bào tử thu hoạch được từ tấm PDA được dùng để chủng ngừa 25 ml môi trường YP+2% glucoza bình thót cổ rung được ngăn và được ủ ở 26°C trong 72 giờ kèm khuấy ở 85 rpm.

ADN bộ gen được phân lập theo phương pháp bộ kit DNeasy Plant Maxi cải biến (Qiagen Danmark, Copenhagen, Đan Mạch). Vật liệu nấm từ nuôi cấy trên được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 14,000 x g trong 2 phút. Dịch nổi được loại ra và 0,5 g viên nhỏ được đông lạnh trong nitơ lỏng với cát thạch anh và được nghiền thành bột mịn cối làm lạnh trước. Bột được chuyển đến ống ly tâm 15 ml và được thêm 5 ml đệm AP1 (gia nhiệt trước đến 65 °C) và 10 µl dung dịch gốc RNaza A (100 mg/ml) sau đó tạo xoáy mạnh. Sau khi ủ trong 10 phút ở 65 °C kèm đảo đều ống, 1,8 ml đệm AP2 được thêm vào sản phẩm phân giải bằng cách trộn nhẹ nhàng sau đó ủ trên đá lạnh trong 10 phút. Sản phẩm phân giải sau đó được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và dịch nổi được lắng gạn vào cột quay QIAshredder Maxi đặt trong ống gom 50 ml. Sau đó được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Chất chảy qua được chuyển vào ống 50 ml mới và được thêm 1,5 thể tích của đệm AP3/E sau đó tạo xoáy. 15 ml mẫu được chuyển vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Chất chảy qua được bỏ đi và 12 ml đệm AW được thêm vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi bỏ đi chất chảy qua, lắp lại ly tâm để loại bỏ rượu còn lại. Cột quay DNeasy Maxi được chuyển đến ống 50 ml mới và 0,5 ml đệm AE (gia nhiệt trước đến 70°C) được thêm. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, mẫu được tách rửa bằng ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Lắp lại tách rửa với 0,5 ml đệm AE bổ sung và nước giải hấp được gom. Nồng độ của ADN thu hoạch được đo bằng phổ quang kế UV ở 260 nm.

Việc cấu trúc vector biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự bộ gen của chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75 mã hóa polypeptit họ GH5 có hoạt tính mananaza

Hai đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp được thể hiện dưới đây được thiết kế để phóng đại PCR gen P23NUR của chủng *Chaetomium virescens* CBS547.75 (SEQ ID NO: 6) từ ADN bộ gen được điều chế như được mô tả ở trên. Bộ kit tách dòng IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) được sử dụng để tách dòng đoạn trực tiếp vào vector biểu hiện pDau109 (WO 2005/042735).

F-P23NUR

5'-acacaactgggatccaccATGAAGGCAATCCTCACAGCC-3' (SEQ ID NO: 9)

R-P23NUR

5'-ccctctagatctcgagTGCGTATCACGGGACTTCAGA-3' (SEQ ID NO: 10)

Chữ in hoa thể hiện trình tự gen. Trình tự gạch chân là tương đồng với vị trí chèn vào của pDau109.

Máy MJ Research PTC-200 ADN được dùng để thực hiện phản ứng PCR. Bộ kit PCR độ tin cậy cao Phusion® (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan) được dùng để khuếch đại PCR. Phản ứng PCR gồm có 5 µl 5X HF đệm (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Phusion® ADN polymeraza (0,2 đơn vị/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 2 µl đoạn mồi F-P23NUR (2,5 µM), 2 µl đoạn mồi R-P23NUR (2,5 µM), 0,5 µl ADN bộ gen *Chaetomium virescens* (100 ng/µl), và 14,5 µl nước khử ion trong tổng thể tích bằng 25 µl. Các điều kiện PCR là 1 vòng ở 95°C trong 2 phút. Mỗi 35



vòng ở 98°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây, và 72°C trong 2,5 phút; và 1 vòng ở 72°C trong 10 phút. Sau đó mẫu được giữ ở 12°C đến khi loại ra khỏi máy PCR.

Sản phẩm phản ứng được phân lập bằng điện di agarosa gel sử dụng 40 mM Tris bazơ, 20 mM natriacetat, 1 mM đệm dinatri EDTA (TAE) trong đó dải sản phẩm 1288 bp được cắt mô từ gel và được tinh chế sử dụng bộ kit tinh chế GFX® PCR ADN và dải gel minh họa (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Đan Mạch) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó đoạn được tách dòng vào pDau109 tự hoại *Bam* HI và *Xho* I sử dụng bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra plasmit pP23NUR. Việc tách dòng gen P23NUR vào pDau109 tự hoại *Bam* HI-*Xho* I tạo ra phiên mã của gen P23NUR của *Chaetomium virescens* dưới kiểm soát của vùng khởi động kép NA2-tpi. NA2-tpi là vùng khởi động được biến đổi từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger* trong đó vùng dẫn đầu không dịch mã được thay bằng vùng dẫn đầu không dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphatisomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Phương pháp tách dòng được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra cấu trúc P23NUR GH5. Plasmit không được xử lý và chèn được biến nạp vào tế bào *E. coli* có khả năng hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được đặt lên tấm LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, các cụm được thấy là phát triển dưới sự chọn lọc trên các tấm LB ampicillin. Bốn dòng vô tính được biến nạp với cấu trúc P23NUR GH5 được cấy trong môi trường LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml và plasmit được phân lập với bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các plasmit được phân lập được sắp trình tự với đoạn mồi vector và đoạn mồi đặc hiệu gen P23NUR để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmit đại diện mà không có lỗi PCR.

Mô tả đặc tính trình tự bộ gen *Chaetomium virescens* CBS547.75 mã hóa polypeptit P23NUR GH5 có hoạt tính mananaza

Việc sắp trình tự ADN của dòng vô tính bộ gen P23NUR GH5 của *Chaetomium virescens* CBS547.75 được thực hiện với thiết bị sắp trình tự ADN tự động hóa Model 3700 hệ sinh học áp dụng sử dụng hóa học trình tự kết thúc BIG-DYE™ phiên bản 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) và chiến lược đi trên đoạn môi. Dữ liệu của trình tự nucleotit được nghiên cứu về chất lượng và tất cả trình tự được so sánh với nhau với sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (Đại học Washington, Seattle, WA, USA).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P23NUR *Chaetomium virescens* được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, tương ứng. Trình tự mã hóa là 1222 bp bao gồm bộ ba mã hóa chặn và bị đứt đoạn bởi hai intron. Protein dự báo được mã hóa là 367 axit amin. Sử dụng chương trình SignalP (Nielsen và cộng sự, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu của 17 gốc được dự báo. Protein chín muối được dự báo (SEQ ID NO: 8) bao gồm 350 axit amin với phân tử khối dự báo bằng 39 kDa và pH đẳng điện bằng 6,9. Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 8 thể hiện hoạt tính mananaza như thể hiện dưới đây.

Việc sắp thẳng hàng tất cả từng cặp so sánh của trình tự axit amin được xác định sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) với điểm phạt mở quãng cách bằng 10, điểm phạt kéo dài quãng cách bằng 0,5, và ma trận EBLOSUM62. Thuật toán thể hiện rằng trình tự axit amin suy ra của gen *Chaetomium virescens* mã hóa P23NUR GH5 polypeptit có hoạt tính mananaza có chung 86% tương đồng (không bao gồm khe) với trình tự axit amin suy ra của protein họ GH5 dự báo từ *Chaetomium globosum* (số truy cập SWISSPROT:Q2H1Y9) với hoạt tính không biết.

#### Biểu hiện của GH5 mananaza P23NUR của *Chaetomium virescens*

Plasmit pP23NUR biểu hiện được biến nạp vào *Aspergillus oryzae* MT3568. *Aspergillus oryzae* MT3568 là AMDS (axetamidaza) bị đứt đoạn có nguồn gốc từ JaL355 (WO 02/40694) trong đó pyrG auxotrophy được phục hồi trong quá trình đánh bại gen *Aspergillus oryzae* axetamidaza (AMDS). Thể nguyên sinh MT3568 được điều chế theo

phương pháp của Sáng chế Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Chất biến nạp được tinh chế trên tấm lựa chọn sucroza COVE qua hạt dính đơn trước khi hình thành bào tử chủng trên tấm PDA. Việc sản xuất *Chaetomium virescens* GH5 polypeptit bằng chất biến nạp được phân tích từ dịch nổi nuôi cấy của 1 ml 96 nuôi cấy tại giếng sâu ở 30°C trong môi trường YP+2% glucoza. Biểu hiện được kiểm tra trên gel 48 giếng E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bằng cách nhuộm màu Coomassie. Một chất biến nạp được chọn để gia công thêm và thiết kế *Aspergillus oryzae* 29.8.

Đối với sản xuất quy mô lớn hơn, bào tử *Aspergillus oryzae* 29.8 được rải lên tấm PDA và được ủ trong năm ngày ở 37°C. Tấm bào tử hợp lưu được rửa hai lần với 5 ml 0,01% TWEEN® 20 để tối đa hóa số lượng bào tử được gom. Huyền phù bào tử sau đó được dùng để chủng ngừa mười lăm bình thốt cổ 500 ml chứa 150 ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Nuôi cấy được ủ ở 30°C kèm lắc cố định ở 100 rpm. Vào ngày bốn sau khi chủng ngừa, nước xuyết nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua thiết bị lọc MF75 Supor MachV 0,2 µm PES nắp chai (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Nước xuyết nuôi cấy mới từ chất biến nạp này tạo ra hai dải protein GH5 bằng xấp xỉ 45 và 50 kDa. Nhận diện của hai dải là polypeptit GH5 *Chaetomium virescens* được kiểm tra bằng cách sắp trình tự peptit. Sự khác biệt giữa kích thước xuất hiện và quan sát được của protein tái tổ hợp có thể góp phần vào việc glycosyl hóa và/hoặc cải biến sau dịch mã khác.

Phương pháp tùy ý sản xuất GH5 mananaza *Chaetomium virescens* (MANANAZA 2)

Trên cơ sở trình tự nucleotit được xác định là SEQ ID NO: 6, gen tổng hợp có thể thu được từ nhiều nhà cung cấp như Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Đức) hoặc DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA). Gen tổng hợp có thể được thiết kế để kết hợp trình tự ADN bổ sung như vị trí tới hạn hoặc vùng tái tổ hợp tương đồng để tạo điều kiện cho việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Sử dụng hai đoạn mỗi oligonucleotit tổng hợp F-P23NUR và R-P23NUR được mô tả ở trên, phản ứng PCR đơn có thể được dùng để khuếch đại khung đọc mở chiều dài đầy đủ từ gen tổng hợp nêu ở SEQ ID NO: 4. Gen sau đó có thể được tách dòng vào vector biểu hiện ví dụ như được mô tả ở trên và được biểu hiện ở tế bào chủ, ví dụ ở *Aspergillus oryzae* như được mô tả ở trên.

#### Tinh chế endo-mananaza của *Chaetomium virescens* (MANANAZA 2)

Nước xyút đã lọc được điều chỉnh đến pH7,0 và được lọc trên thiết bị lọc PES 0,22µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware cat#595-4520). Sau đó, phần lọc được thêm 1,8M amoni sulphat. Phần lọc được tải lên cột chảy nhanh 6 Phenyl Sepharose™ (sub cao) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng với 1,8M amoni sulphat, 25mM HEPES pH7,0. Sau khi rửa với 1,0M amoni sulphat, các protein liên kết được tách rửa cả mẻ với 25 mM HEPES pH 7,0. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE. Các đoạn được trộn và được áp dụng lên cột Sephadex™ G-25 (môi trường) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 12,5 mM axit axetic pH 4,3 được điều chỉnh với NaOH. Các đoạn được áp dụng cho cột SOURCE™ 15S (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 12,5 mM axit axetic pH 4,3/NaOH và các protein liên kết được tách rửa với gradien tuyến tính từ 0-1000 mM natri clorua qua 20CV. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE.

#### Ví dụ 3: Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo-mananaza của *Sordaria macrospora* (MANANAZA 3)

##### Chủng

Chủng *Sordaria macrospora* DSM997 được dùng làm nguồn polypeptit có hoạt tính mananaza. Chủng *Aspergillus oryzae* MT3568 được dùng để biểu hiện gen *Sordaria macrospora* mã hóa polypeptit có hoạt tính mananaza. *A. oryzae* MT3568 là gen *amdS* (axetamidaza) bị đứt đoạn có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694) trong đó *pyrG* auxotrophy được phục hồi bằng cách làm đứt đoạn gen *A. oryzae* axetamidaza (*amdS*).

Việc chiết ADN bộ gen của chủng *Sordaria macrospora* DSM997

Để tạo ra ADN bộ gen để khuếch đại PCR, chủng *Sordaria macrospora* DSM997 được nhân giống trên tấm aga PDA bằng cách nuôi ở 26°C trong 7 ngày. Bào tử thu hoạch được từ tấm PDA được dùng để chủng ngừa 25 ml môi trường YP+2% glucoza bình thót cổ rung được ngăn và được ủ ở 26°C trong 72 giờ kèm khuấy ở 85 rpm.

ADN bộ gen được phân lập theo phương pháp bộ kit DNeasy Plant Maxi cải biến (Qiagen Denmark, Copenhagen, Đan Mạch). Vật liệu nấm từ nuôi cấy trên được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 14,000 x g trong 2 phút. Dịch nổi được loại ra và 0,5 g viên nhỏ được đông lạnh trong nitơ lỏng với cát thạch anh và được nghiền thành bột mịn cối làm lạnh trước. Bột được chuyển đến ống ly tâm 15 ml và được thêm 5 ml đệm AP1 (gia nhiệt trước đến 65 °C) và 10 µl dung dịch gốc RNaza A (100 mg/ml) sau đó tạo xoáy mạnh. Sau khi ủ trong 10 phút ở 65 °C kèm đảo đều ống, 1,8 ml đệm AP2 được thêm vào sản phẩm phân giải bằng cách trộn nhẹ nhàng sau đó ủ trên đá lạnh trong 10 phút. Sản phẩm phân giải sau đó được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và dịch nổi được lắng gạn vào cột quay QIAshredder Maxi đặt trong ống gom 50 ml. Sau đó ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Chất chảy qua được chuyển vào ống 50 ml mới và được thêm 1,5 thể tích của đệm AP3/E sau đó tạo xoáy. 15 ml mẫu được chuyển vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Chất chảy qua được bỏ đi và 12 ml đệm AW được thêm vào cột quay DNeasy Maxi đặt trong ống gom 50 ml và được ly tâm ở 3000 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi bỏ đi chất chảy qua, lặp lại ly tâm để loại bỏ rượu còn lại. Cột quay DNeasy Maxi được chuyển đến ống 50 ml mới và 0,5 ml đệm AE (gia nhiệt trước đến 70°C) được thêm. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, mẫu được tách rửa bằng ly tâm ở 3000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Lặp lại tách rửa với 0,5 ml đệm AE bổ sung và nước giải hấp được gom. Nồng độ của ADN thu hoạch được đo bằng phổ quang kế UV ở 260 nm.

Việc tạo cấu trúc của vectơ biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự bộ gen của chủng *Sordaria macrospora* DSM997 mã hóa polypeptit họ GH5 có hoạt tính mananaza

Hai đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp được thể hiện dưới đây được thiết kế để phóng đại PCR gen P2453A của chủng *Sordaria macrospora* DSM997 (SEQ ID NO: 11) từ ADN bộ gen được điều chế như được mô tả ở trên. P2453A tương ứng với trình tự bộ gen của đầu vào SwissProt D1ZM91, được chú thích là xenlulaza giả định là GH5. Bộ kit tách dòng

IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) được sử dụng để tách dòng đoạn trực tiếp vào vector biểu hiện pDau109 (WO 2005/042735).

F-P2453A

5'-acacaactggggatccaccATGAAGTCCTTGTTACCCCTCGCC-3' (SEQ ID NO: 14)

R-P2453A

5'-ccctctagatctcgagGTACGCAGCCACGGCGACA-3' (SEQ ID NO: 15)

Chữ in hoa thể hiện trình tự gen. Trình tự gạch chân là tương đồng với vị trí chèn vào của pDau109.

Máy MJ Research PTC-200 ADN được dùng để thực hiện phản ứng PCR. Bộ kit PCR độ tin cậy cao Phusion® (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan) được dùng để khuếch đại PCR. Phản ứng PCR gồm có 5 µl 5X HF đệm (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Phusion® ADN polymeraza (0,2 đơn vị/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Phần Lan), 2 µl đoạn mỗi F-P2453A (2,5 µM), 2 µl đoạn mỗi R-P2453A (2,5 µM), 0,5 µl ADN bộ gen *Sordaria macrospora* (100 ng/µl), và 14,5 µl nước khử ion trong tổng thể tích bằng 25 µl. Các điều kiện PCR là 1 vòng ở 95°C trong 2,5 phút. Mỗi 35 vòng ở 98°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây, và 72°C trong 2,5 phút; và 1 vòng ở 72°C trong 10 phút. Sau đó mẫu được giữ ở 12°C đến khi loại ra khỏi máy PCR.

Sản phẩm phản ứng được phân lập bằng điện di agarosa gel 1.0% sử dụng 40 mM Tris bazơ, 20 mM natriacetat, 1 mM đệm dinatri EDTA (TAE) trong đó dải sản phẩm 1260 bp được cắt mô từ gel và được tinh chế sử dụng bộ kit tinh chế GFX® PCR ADN và dải gel minh họa (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Đan Mạch) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó đoạn được tách dòng vào pDau109 tự hoại *Bam* HI và *Xho* I sử dụng bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra plasmit pP2453A. Việc tách dòng gen P2453A vào pDau109 tự hoại *Bam* HI-*Xho* I tạo ra phiên mã của gen P2453A *Sordaria macrospora* dưới kiểm soát của vùng khởi động kép NA2-tpi. NA2-tpi là vùng khởi động được biến đổi từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính *Aspergillus niger* trong đó vùng dẫn đầu không

dịch mã được thay bằng vùng dẫn đầu không dịch mã từ gen mã hóa *Aspergillus nidulans* trioza phosphatisomeraza.

Phương pháp tách dòng được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit tách dòng INFUSION™ tạo ra cấu trúc P2453A GH5. Plasmid không được xử lý và chèn được biến nạp vào tế bào *E. coli* có khả năng hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được đặt lên tấm LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, các cụm được thấy là phát triển dưới sự chọn lọc trên các tấm LB ampicillin. Hai cụm được biến nạp với cấu trúc P2453A GH5 được cấy trong môi trường LB được tạo huyền phù với 0,1 mg ampicillin mỗi ml và plasmid được phân lập với bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các plasmid được phân lập được sắp trình tự với đoạn mỗi vector và đoạn mỗi đặc hiệu gen P2453A để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmid đại diện mà không có lỗi PCR.

Mô tả đặc tính trình tự bộ gen DSM997 của *Sordaria macrospora* mã hóa polypeptit P2453A GH5 có hoạt tính mananaza

Việc sắp trình tự ADN của dòng vô tính bộ gen DSM997 P2453A GH5 của *Sordaria macrospora* được thực hiện với thiết bị sắp trình tự ADN tự động hóa Model 3700 hệ sinh học áp dụng sử dụng hóa học kết thúc BIG-DYE™ phiên bản 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) và chiến lược đi trên đoạn mỗi. Dữ liệu của trình tự nucleotit được nghiên cứu về chất lượng và tất cả trình tự được so sánh với nhau với sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (Đại học Washington, Seattle, WA, USA).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P2453A *Sordaria macrospora* được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng. Trình tự mã hóa là 1203 bp bao gồm bộ ba mã hóa chặn và bị đứt đoạn bởi hai intron. Protein dự báo được mã hóa là 361 axit amin. Sử dụng chương trình SignalP (Nielsen và cộng sự, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu của 17 gốc được dự báo. Protein chín muối được dự báo bao gồm 344 axit amin (SEQ ID NO: 13) với phân tử khối dự báo bằng 38 kDa và pH

đẳng điện bằng 6,4. Polypeptit nêu ở SEQ ID NO: 13 thể hiện hoạt tính mananaza như thể hiện dưới đây.

Việc sắp thẳng hàng tất cả từng cặp so sánh của trình tự axit amin được xác định sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) với điểm phạt mở quãng cách bằng 10, điểm phạt kéo dài quãng cách bằng 0,5, và ma trận EBLOSUM62. Thuật toán thể hiện rằng trình tự axit amin suy ra của gen *Sordaria macrospora* mã hóa polypeptit P2453A GH5 có hoạt tính mananaza có chung 77% tương đồng (không bao gồm khe) với trình tự axit amin suy ra của protein họ GH5 dự báo *Chaetomium globosum* (số truy cập SWISSPROT:Q2H1Y9) với hoạt tính không biết.

#### Biểu hiện của mananaza GH5 *Sordaria macrospora* (MANANAZA 3)

Plasmid pP2453A biểu hiện được biến nạp vào MT3568 của *Aspergillus oryzae*. MT3568 của *Aspergillus oryzae* là AMDS (axetamidaza) bị đứt đoạn có nguồn gốc từ JaL355 (WO 02/40694) trong đó pyrG auxotrophy được phục hồi trong quá trình đánh bại gen *Aspergillus oryzae* axetamidaza (AMDS). Thể nguyên sinh MT3568 được điều chế theo phương pháp của Sáng chế Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Chất biến nạp được tinh chế trên tấm lựa chọn sucroza COVE qua hạt dính đơn trước khi hình thành bào tử chúng trên tấm PDA. Việc sản xuất polypeptit GH5 *Sordaria macrospora* bằng chất biến nạp được phân tích từ dịch nổi nuôi cấy bằng 1 ml 96 nuôi cấy tại giếng sâu ở 30°C trong môi trường YP+2% glucoza. Biểu hiện được kiểm tra trên gel 48 giếng E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bằng cách nhuộm màu Coomassie. Một chất biến nạp được chọn để gia công thêm và thiết kế *Aspergillus oryzae* 46.7.

Đối với sản xuất quy mô lớn hơn, các bào tử *Aspergillus oryzae* 46.7 được rải lên tấm PDA và được ủ trong năm ngày ở 37°C. Tấm bào tử hợp lưu được rửa hai lần với 5 ml 0,01% TWEEN® 20 để tối đa hóa số lượng bào tử được gom. Huyền phù bào tử sau đó được dùng để chủng ngừa mười lăm bình thốt cổ 500 ml chứa 150 ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Nuôi cấy được ủ ở 30°C kèm lắc cố định ở 100 rpm. Vào ngày bốn



sau khi chủng ngừa, nước xuất nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua thiết bị lọc MF75 Supor MachV 0,2 µm PES nắp chai (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Nước xuất nuôi cấy mới từ chất biến nạp này tạo ra hai dải protein GH5 bằng xấp xỉ 47 và 50 kDa. Nhận diện của hai dải là polypeptit GH5 *Sordaria macrospora* được kiểm tra bằng cách sắp trình tự peptit. Khác biệt giữa kích thước xuất hiện và quan sát được của protein tái tổ hợp có thể góp phần vào việc glycosyl hóa và/hoặc cải biến sau dịch mã khác.

Phương pháp khác sản xuất mananaza GH5 *Sordaria macrospora* (MANANAZA 3)

Trên cơ sở trình tự nucleotit được xác định là SEQ ID NO: 11, gen tổng hợp có thể thu được từ nhiều nhà cung cấp như Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Đức) hoặc DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA). Gen tổng hợp có thể được thiết kế để kết hợp trình tự ADN bổ sung như vị trí tới hạn hoặc vùng tái tổ hợp tương đồng để tạo điều kiện cho việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Sử dụng hai đoạn môi oligonucleotit tổng hợp F-P2453A và R-P2453A được mô tả ở trên, phản ứng PCR đơn có thể được dùng để khuếch đại khung đọc mở chiều dài đầy đủ từ gen tổng hợp nêu ở SEQ ID NO: 7. Gen sau đó có thể được tách dòng vào vector biểu hiện ví dụ như được mô tả ở trên và được biểu hiện ở tế bào chủ, ví dụ ở *Aspergillus oryzae* như được mô tả ở trên.

Tinh chế endo-mananaza *Sordaria macrospora* (MANANAZA 3)

Nước xuất đã lọc được điều chỉnh đến pH7,0 và được lọc trên thiết bị lọc PES 0,22µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware cat#595-4520). Sau đó, phần lọc được thêm 1,8M amoni sulphat. Phần lọc được tải lên cột chảy nhanh 6 Phenyl Sepharose™ (sub cao) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng với 1,8M amoni sulphat, 25mM HEPES pH7,0. Sau khi rửa với 1,0M amoni sulphat, các protein liên kết được tách rửa cả mẻ với 12,5 mM HEPES pH 7,0. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE. Các đoạn được trộn và được áp dụng lên cột Sephadex™ G-25 (medium) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 25 mM HEPES pH 7,0. Các đoạn được áp

dụng cho cột SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) được làm cân bằng trong 12,5 mM HEPES pH 7,5 và các protein liên kết được tách rửa với gradien tuyến tính từ 0-1000 mM natri clorua qua 20CV. Các đoạn được gom và phân tích bởi SDS-PAGE. Protein được tái tạo trong phần ra.

Ví dụ 4: Tính ổn định nhiệt của mananaza được đánh giá bằng DSC

MANANAZA 4 được sử dụng ở đây và một số trong các ví dụ sau đây là GH5\_8 mananaza thu được ban đầu từ *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* và có trình tự axit amin được thể hiện bởi trình tự axit amin chín muối nêu ở SEQ ID NO: 17. Trình tự axit amin chín muối được xác định là axit amin 28-319 bằng cách sắp trình tự đầu N và sắc phổ khối (MS) của protein chiều dài đầy đủ. Trình tự axit amin chín muối được thể hiện là SEQ ID NO: 18.

Tính ổn định nhiệt MANANAZA 1, MANANAZA 2, MANANAZA 3 và MANANAZA 4 được đánh giá bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) trong dung dịch đệm thích hợp (20 mM Natriacetat pH 5). Nhiệt độ tương ứng với đỉnh của góc trong biểu đồ nhiệt như được nêu là điểm giữa chuyển tiếp nhiệt ( $T_m$  (°C)) đối với enzym.

Bảng 1: Nhiệt độ điểm giữa

| Enzym      | Nhiệt độ (°C) |
|------------|---------------|
| MANANAZA 1 | 93            |
| MANANAZA 2 | 69            |
| MANANAZA 3 | 74            |
| MANANAZA 4 | 92            |

Để so sánh, điểm giữa chuyển tiếp nhiệt đối với Mannaway được xác định bằng DSC ở pH 5 là 73°C. Điểm giữa chuyển tiếp nhiệt đối với Gamanaza (beta-mananaza từ *Aspergillus niger*) được xác định bằng DSC ở pH 5 là 87°C. và điểm giữa chuyển tiếp nhiệt

đối với beta-mannanase từ *Trichoderma reesei* được sử dụng trong Ví dụ 10 được xác định bằng DSC ở pH 5 và 81°C.

Ví dụ 5: Hoạt tính mannanase lên AZCL-galactomannan

Hoạt tính của mannanase được thử bằng cách thủy phân 0,2 khối lượng/thể tích% AZCL-galactomannan trong 50mM đệm Britton-Robinson (50mM axit phosphoric, 50mM axit axetic, 50mM axit boric, 50mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>) và 0,01% Triton X-100, pH 5 ở 40°C trong 10 phút. Mannanase thử nghiệm và Mannaway® 25L được thêm riêng rẽ để tạo ra nồng độ cuối bằng 0-0,01 mg/ml. Phản ứng được kết thúc trên đá lạnh/bể nước. Sau khi ly tâm (10,000rpm, 5 min ở 4°C), dịch nổi được chuyển vào tấm vi chuẩn và độ hút ở 595 nm được đo. Quy trình được thực hiện trong ba mẫu lặp lại đối với tất cả enzym và mẫu trống (không enzym). Đối với tất cả 4 enzym đáp ứng liều có thể quan sát được (Bảng 2).

Bảng 2. Độ hút ở 600 nm.

|         | Mannawa          | MANANAZ          | MANANAZ          | MANANAZ          |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Nồng độ | y                | A 1              | A 2              | A3               |
| (mg/mL) | A <sub>600</sub> | A <sub>600</sub> | A <sub>600</sub> | A <sub>600</sub> |
| 0,0100  | 0,529            | 1,201            | 0,463            | 0,294            |
| 0,0075  | 0,405            | 1,034            | 0,381            | 0,233            |
| 0,0050  | 0,282            | 0,811            | 0,295            | 0,163            |
| 0,0025  | 0,156            | 0,535            | 0,178            | 0,087            |
| 0,0010  | 0,070            | 0,257            | 0,082            | 0,037            |
| 0,0000  | 0,000            | 0,000            | 0,000            | 0,000            |

Ví dụ 6: Xử lý trước của vật liệu cà phê

800 mL nước sôi được thêm vào 155 g hạt cà phê Arabica rang và xay với kích thước hạt bằng 0,5 mm. Sau khi ủ trong bể nước ở 95°C trong 30 phút kèm trộn bằng tay mỗi 5 phút, bột nhão được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Sau khi lọc chân không ban đầu qua thiết bị lọc Whatman GF/D, Ø 150 mm, cà phê pha rồi không tan trên thiết bị lọc được rửa bằng cách thêm 500 - 1000 mL nước MilliQ. Cà phê pha rồi được loại ra khỏi thiết bị lọc và trải lên tấm lớn và để khô qua đêm. Bã cà phê pha rồi còn được tách béo bằng butanol bão hòa nước. Phần butanol được tách bằng cách lọc và bã cà phê pha rồi tách béo được làm khô dưới chân không trước khi sử dụng. Bã cà phê pha rồi tách béo này được sử dụng trong Ví dụ 7.

Ví dụ 7: Thủy phân được xúc tác enzym của bã cà phê pha rồi tách béo

#### a) Chiết enzym

Bã cà phê pha rồi tách béo được tạo ra theo Ví dụ 6 (10 khối lượng %) được ủ với nước và enzym pha loãng thích hợp (để tạo ra nồng độ phản ứng cuối bằng 1,47 nM đối với MANANAZA 1-4 và 0,2% Mannaway® 25L) ở 50°C. Các mẫu được rút ra sau 2 và 24 giờ và thủy phân enzym được dừng ngay bằng cách gia nhiệt các mẫu ở 100°C trong 10 phút. Sau khi ly tâm (10,000×g, 10 phút) và lọc qua thiết bị lọc 0,22 µm, dịch nổi được phân tích thêm về chất khô, chế phẩm carbohydrat và độ hút. Quy trình được thực hiện trong mẫu lặp đối với tất cả enzym và mẫu trống (không có enzym được thêm).

#### b) Xác định chất khô

Hàm lượng chất khô (DM) được định lượng sau khi làm khô qua đêm ở 110°C của dịch nổi từ bã cà phê pha rồi được xử lý enzym. Khối lượng của chất khô được chia cho thể tích được thêm của dịch nổi và giá trị DM trên cơ sở g/L được tính toán. Đặc điểm của chiết xuất trên cơ sở DM được tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 3: Chất khô của chiết xuất bã pha rồi tách béo sau các xử lý enzym khác nhau.

| Chất khô (g/L) |    |     |
|----------------|----|-----|
| Xử lý enzym    | 2h | 24h |

|             |      |      |
|-------------|------|------|
| Không enzym | 2,8  | 2,5  |
| Mannaway    | 6,1  | 7,2  |
| MANANAZA 1  | 10,0 | 16,1 |
| MANANAZA 2  | 9,6  | 11,3 |
| MANANAZA 3  | 8,0  | 9,1  |
| MANANAZA 4  | 8,1  | 9,2  |

Tất cả mananaza thử nghiệm hòa tan chất khô nhiều hơn so với Mannaway, đều sau 2 giờ và 24 giờ thời gian ủ (Bảng 3).

#### c) Phân tích carbohydrat

Chế phẩm đường được phân tích bằng cách đo monosaccarit tự do trong dịch nổi bằng sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với phát hiện xung dòng điện (HPAEC-PAD). Tổng số đường được phân tích bằng HPAEC-PAD sau khi thủy phân axit trong 2 M triflo axit axetic trong 2 h ở 95°C. Các mẫu được thủy phân axit được trung hòa bằng cách pha loãng ban đầu trong 0,2 M NaOH. Monosaccarit được định lượng sau khi pha loãng thích hợp đối với đường cong tiêu chuẩn 5 điểm của arabinoza (Ara), galactoza (Gal), glucoza (Glc) và mannoza (Man) trong khoảng từ 0,002-0,02 g/L. Các kết quả có thể xem trong Bảng 4, Bảng 5 và Bảng 6.

Bảng 4: Monosaccarit tự do trong chiết xuất từ bã cà phê pha rồi tách béo sau xử lý enzym.

|             | Monosaccarit tự do /DM (%) |     |     |     |
|-------------|----------------------------|-----|-----|-----|
|             | 2h                         |     | 24h |     |
| Xử lý enzym | Glu                        | Man | Glu | Man |

|             |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|
| Không enzym | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Mannaway    | 0   | 1,5 | 0   | 1,5 |
| MANANAZA 1  | 0,2 | 2,0 | 0,2 | 4,6 |
| MANANAZA 2  | 0   | 1,6 | 0   | 2,3 |
| MANANAZA 3  | 0   | 0,4 | 0   | 0,5 |

Bảng 5: Tổng số chế phẩm đường trong chiết xuất từ bã cà phê pha rồi tách béo sau xử lý enzym. Monosaccarit trong dịch nổi sau thủy phân axit.

| Xử lý enzym | Tổng số monosaccarit/DM (%) |     |     |      |     |     |     |      |
|-------------|-----------------------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|
|             | 2h                          |     |     |      | 24h |     |     |      |
|             | Ara                         | Gal | Glu | Man  | Ara | Gal | Glu | Man  |
| Không enzym | 0,7                         | 2,4 | 0,8 | 11,0 | 1,7 | 6,1 | 0,9 | 15,2 |
| Mannaway    | 0,7                         | 2,7 | 1,1 | 19,6 | 0,9 | 3,9 | 0,6 | 21,3 |
| MANANAZA 1  | 0,5                         | 2,4 | 1,3 | 18,7 | 0,6 | 3,2 | 0,4 | 20,0 |
| MANANAZA 2  | 0,5                         | 2,5 | 1,1 | 18,9 | 0,7 | 3,5 | 0,4 | 20,4 |
| MANANAZA 3  | 0,5                         | 2,6 | 1,1 | 18,3 | 0,8 | 3,6 | 0,4 | 19,8 |

Bảng 6: Phần trăm saccarit có mặt là monosaccarit trên cơ sở khối lượng của tổng số đường là monosaccarit.

Monosaccarit tự do  
/ Tổng số đường  
(%)

| Xử lý enzym | 2h | 24h |
|-------------|----|-----|
| Không enzym | 0  | 0   |
| Mannaway    | 6  | 6   |
| MANANAZA 1  | 10 | 20  |
| MANANAZA 2  | 7  | 9   |
| MANANAZA 3  | 2  | 2   |

d) Độ hút

Độ hút ở 361 nm của các mẫu được đo sau khi pha loãng thích hợp các dịch nổi và kiềm hóa bởi ít nhất pha loãng 1:10 trong 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Chia độ hút cho DM (g/L) tạo ra số đo chất lượng liên quan đến màu được giải phóng bởi DM (Bảng 7). Mananaza được giải phóng tương tự màu mỗi DM là Mannaway.

Bảng 7: Chất lượng của chiết xuất. Độ hút của chiết xuất extract sau khi kiềm hóa ở 361 nm mỗi chất khô.

|             | Độ hút<br>(A <sub>361</sub> *L/g) |      |
|-------------|-----------------------------------|------|
| Xử lý enzym | 2h                                | 24h  |
| Mannaway    | 0,04                              | 0,05 |
| MANANAZA 1  | 0,04                              | 0,04 |
| MANANAZA 2  | 0,04                              | 0,03 |
| MANANAZA 3  | 0,04                              | 0,04 |

Ví dụ 8: Thủy phân được xúc tác enzym của bã cà phê pha rồi tách béo

Việc hòa tan enzym của bã cà phê pha rồi tách béo được thực hiện với Mannaway và MANANAZA4 sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 7. Khác nhau là hai nhiệt độ được thử để chiết enzym, 50°C và 80°C, và chất khô được đo trên các dịch nổi thu được.

Bảng 8. Chất khô của bã pha rồi tách béo chiết xuất sau khi xử lý enzym khác nhau ở 50°C và 80°C

| Xử lý enzym | Chất khô (g/L) |     |      |      |
|-------------|----------------|-----|------|------|
|             | 50°C           |     | 80°C |      |
|             | 2h             | 24h | 2h   | 24h  |
| Không enzym | 1,2            | 0,5 | 1,4  | 3,2  |
| Mannaway    | 5,8            | 6,7 | 4,6  | 3,6  |
| MANANAZA 4  | 8,1            | 9,2 | 8,8  | 11,4 |

Bảng 8 thể hiện rõ rằng việc sử dụng mananaza chịu nhiệt cho phép nhiệt độ hòa tan cao hơn và đạt được mức hòa tan cao hơn ở liều enzym bằng nhau.

Ví dụ 9: Thủy phân được xúc tác enzym của bã cà phê pha rồi

Điều chế cà phê pha rồi

Hạt Arabica rang (238 g) được xay sử dụng sàng 1 mm và đoạn nghiền tạo thành được chiết với nước sôi ở chất khô bằng 20 %. Nhiệt độ sau khi trộn là 87 °C. Bã cà phê pha rồi được phân tách từ dịch lỏng bằng lọc chân không sử dụng thiết bị Whatman GF/D sau 10 phút trộn. Cà phê pha rồi được rửa với lượng dư nước trước khi làm khô qua đêm ở 60 °C. Trên cơ sở chất khô trong phần lọc phần chia chất khô là 25 % trong pha lỏng và 75 % trong pha rắn.

Thủy phân enzym của cà phê pha rồi được tạo ra



Bã cà phê pha rồi được tạo ra như được mô tả ở trên được ủ ở 10 khối lượng% với nước và mananaza pha loãng thích hợp (để tạo ra nồng độ phản ứng cuối bằng 50 mg/L đối với MANANAZA 1, MANANAZA 4 và 0,2 thể tích % Mannaway® 25L) ở 50, 70, 80 và 90 °C. Các mẫu bất hoạt nhiệt ở 100 °C trong 10 phút sau 2 hoặc 24 giờ thủy phân enzym. Sau khi ly tâm (10,000×g, 10 phút) và lọc qua thiết bị lọc 0,22 µm, dịch nổi được phân tích về chất khô. Quy trình được thực hiện trong mẫu lặp đối với tất cả enzym và mẫu trống (không có enzym được thêm).

Chất khô được đo như được mô tả trong Ví dụ 7.

Bảng 9. Tác dụng của nhiệt độ và thời gian lên mức hòa tan của cà phê pha rồi

|                | 2 giờ           |      |      |                 | 24 giờ |      |      |      |
|----------------|-----------------|------|------|-----------------|--------|------|------|------|
| Xử lý          | 50°C            | 70°C | 80°C | 90°C            | 50°C   | 70°C | 80°C | 90°C |
| Không enzym    | 1% <sup>1</sup> | 2%   | 2%   | 3%              | 3%     | 4%   | 5%   | 7%   |
| Mannaway® 25 L | 4%              | 3%   | 2%   | 3%              | 7%     | 4%   | 5%   | 8%   |
| MANANAZA 1     | 4%              | 5%   | 5%   | 3%              | 9%     | 12%  | 10%  | 8%   |
| MANANAZA 4     | 6%              | 9%   | 10%  | 1% <sup>1</sup> | 14%    | 21%  | 17%  | 10%  |

<sup>1</sup> Sai lệch tiêu chuẩn trên 1 điểm phần trăm

Mannaway có thể hòa tan một số bã cà phê pha rồi ở 50°C ở cả thời gian ủ ngắn và dài nhưng ở nhiệt độ ở hoặc trên 70°C không có sự hòa tan đáng kể so với mẫu không được xử lý. Đối với MANANAZA 1 và MANANAZA 4 tối ưu hòa tan đối với ủ enzym dài hơn là 70°C và ở thời gian ủ ngắn hơn 70-80°C là khoảng nhiệt độ tối ưu (Bảng 9). MANANAZA 1 và MANANAZA 4 do đó có thể được sử dụng ở nhiệt độ cao hơn trong đó sản lượng chiết tăng đáng kể được thấy và do đó dẫn đến tính kinh tế của quy trình tốt hơn.

Ví dụ 10:

Bã cà phê được điều chế theo Ví dụ 6 được sử dụng ở nồng độ thử nghiệm cuối bằng 10% chất khô và được thủy phân trong 2 hoặc 24 giờ ở 55°C trên máy lắc điều nhiệt ở 1200 rpm. Nồng độ enzym là 0,5 mg enzym mỗi kg bã cà phê pha rồi. Enzym được bất hoạt bằng cách làm sôi trong 10 phút và dịch nổi được chuyển vào ống riêng sau 10 phút ly tâm ở 10,000 rfc. Xấp xỉ 0,75 g chiết xuất được lấy ra và chất lỏng được bay hơi ở 105°C trước khi chất khô được ghi.

Gamanaza là beta-mannanaza từ *Aspergillus niger*. "*T. reesei* + CBM1" là beta-mannanaza từ *Trichoderma reesei* bao gồm vùng liên kết CBM1 có trình tự axit amin được thể hiện là axit amin 1 đến 418 nêu ở SEQ ID NO: 19. "*T. reesei* - CBM1" là beta-mannanaza từ *Trichoderma reesei* không có vùng liên kết CBM1 có trình tự axit amin được thể hiện là axit amin 1 đến 355 nêu ở SEQ ID NO: 20.

Bảng 10. Hòa tan enzym của bã cà phê tách béo so với mẫu trống với không có enzym được thêm

|                          | 2 giờ    | 24 giờ    |
|--------------------------|----------|-----------|
| Không có enzym được thêm | 1,1±0,2% | 3,0±0,1%  |
| Mannaway                 | 2,2±0,1% | 2,7±0,2%  |
| MANANAZA 1               | 7,5±0,1% | 14,7±0,2% |
| Gamanaza                 | 1,9±0,1% | 5,2±0,1%  |
| <i>T. reesei</i> + CBM1  | 4,5±0,3% | 10,3±0,2% |
| <i>T. reesei</i> - CBM1  | 2,9±0%   | 8,1±0,2%  |

Sáng chế được mô tả và được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này không bị giới hạn trong phạm vi của các khía cạnh cụ thể được bộc lộ ở đây, vì các khía cạnh này chỉ nhằm để minh họa cho một vài khía cạnh của sáng chế. Các khía cạnh tương đương bất kỳ được dự định là nằm trong phạm vi của sáng chế. Thật vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế

ngoài ra các cải biến đã được thể hiện và đã được mô tả trong bản mô tả này sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực từ phần mô tả trên đây. Các cải biến này cũng được dự định là thuộc phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Trong trường hợp có mâu thuẫn, phần bộc lộ có bao gồm các định nghĩa sẽ được áp dụng.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Phương pháp sản xuất chiết xuất cà phê, bao gồm các bước:

- a. tạo ra hạt cà phê rang và xay;
  - b. tùy ý thực hiện một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất hạt cà phê này;
  - c. thêm vào hạt cà phê này, mà tùy ý được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất, nước và enzym có hoạt tính mananaza;
  - d. ủ để tạo ra chiết xuất cà phê nước; và
  - e. tách chiết xuất cà phê từ hạt cà phê được chiết xuất,
- trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 70% tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 3.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong các điểm 1-2, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là ổn định nhiệt.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong các điểm 1-3, trong đó enzym có hoạt tính mananaza có nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) được xác định bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) bằng ít nhất 80°C, tốt hơn là ít nhất 85°C hoặc ít nhất 90°C.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-4, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện trong ít nhất một giờ.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-5, trong đó việc ủ trong bước d được thực hiện ở nhiệt độ ít nhất 60°C như ít nhất là 65°C, tốt hơn là ít nhất 70°C như ít nhất là 75°C hoặc ít nhất 80°C.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là endo-beta-1,4-mananaza.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó enzym có hoạt tính mananaza là GH5 endo-beta-1,4-mananaza, tốt hơn là GH5\_7 endo-beta-1,4-mananaza hoặc GH5\_8 endo-beta-1,4-mananaza.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó hạt cà phê rang và xay được đưa qua một hoặc nhiều bước chiết thứ nhất trước bước c.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nỗ hơi nước được thực hiện sau bước chiết thứ nhất và trước bước c.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9 hoặc 10, trong đó bước nghiền thứ hai hạt cà phê được thực hiện sau bước chiết thứ nhất và trước bước c.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó chiết xuất cà phê thu được ở bước e bao gồm nhiều hơn ít nhất 100% chất khô so với chiết xuất cà phê được điều chế bằng phương pháp tương tự mà không bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9-12, trong đó ít nhất 8% theo khối lượng của chất khô của hạt cà phê được chiết xuất một phần thu được sau bước b được thu lại trong chiết xuất cà phê thu được ở bước e.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novozymes A/S

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHIẾT XUẤT CÀ PHÊ

<130> 12696-WO-PCT

<160> 20

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1548

<212> ADN

<213> *Talaromyces leycettanus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(169)

<220>

<221> Intron

<222> (170)..(263)

<220>

<221> CDS

<222> (264)..(971)

<220>

<221> Intron

<222> (972)..(1053)

<220>

<221> CDS

<222> (1054)..(1182)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (1183)..(1258)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1259)..(1545)

&lt;400&gt; 1

atg aag ttg tct acc ctc aat ttc ctg tcc ttg gcc ggt ctg gtg tct 48

Met Lys Leu Ser Thr Leu Asn Phe Leu Ser Leu Ala Gly Leu Val Ser

1 5 10 15

gcc cag gtt gcc aac tat ggc caa tgt ggt gga cag aat tat tct ggc 96

Ala Gln Val Ala Asn Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Asn Tyr Ser Gly

20 25 30

ccg aca act tgc aat ccg ggc tgg tct tgc caa tat ctg aat cca tat 144

Pro Thr Thr Cys Asn Pro Gly Trp Ser Cys Gln Tyr Leu Asn Pro Tyr

35 40 45

tat agc cag tgt ctt cca gct acc c gatatgtcgac tacactcatg 189

Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ala Thr

50 55

tgcatatcag actctgatgt tcccatccgc ttttggtact acattcttgt ttccttgcta 249

attcatcaac acag aa acg acc act ctg acg acg tcg acg aag ccc acc 298

Gln Thr Thr Thr Leu Thr Thr Ser Thr Lys Pro Thr

60 65

agc acc agc acc acc acc aga acc agt acc agt acc acc agc acc cag 346

Ser Thr Ser Thr Thr Thr Arg Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gln

70 75 80

ggc ggc tcg tca agc aca tct ata ccc agc aag aat ggt ctc aag ttt 394

Gly Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Lys Asn Gly Leu Lys Phe

85 90 95 100

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| acc att gac ggc aag acc gcc tac tat gca ggc acc aac acc tac tgg | 442 |
| Thr Ile Asp Gly Lys Thr Ala Tyr Tyr Ala Gly Thr Asn Thr Tyr Trp |     |
| 105 110 115                                                     |     |
| ctc ccg ttc ctg acc aac aat gcg gat gtt gat ctg gtc atg agc cat | 490 |
| Leu Pro Phe Leu Thr Asn Asn Ala Asp Val Asp Leu Val Met Ser His |     |
| 120 125 130                                                     |     |
| ctc caa caa tcc ggc ctc aag atc ctt cgt gtc tgg ggc ttc aac gac | 538 |
| Leu Gln Gln Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp |     |
| 135 140 145                                                     |     |
| gtc aac acc cag cca gga agt ggc acc gtg tgg ttc cag ctg ctc cag | 586 |
| Val Asn Thr Gln Pro Gly Ser Gly Thr Val Trp Phe Gln Leu Leu Gln |     |
| 150 155 160                                                     |     |
| aac ggc cag gcg act atc aac acg ggc gcc aat ggt cta cag cgc ctc | 634 |
| Asn Gly Gln Ala Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asn Gly Leu Gln Arg Leu |     |
| 165 170 175 180                                                 |     |
| gac tac gtg gtg caa tct gcg gaa gct cac gat atc aaa ctg atc att | 682 |
| Asp Tyr Val Val Gln Ser Ala Glu Ala His Asp Ile Lys Leu Ile Ile |     |
| 185 190 195                                                     |     |
| aac ttt gtc aac aac tgg aac gat tat ggc ggc atc aac gcg tac gtc | 730 |
| Asn Phe Val Asn Asn Trp Asn Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val |     |
| 200 205 210                                                     |     |
| aat aac tat ggc ggt aat gca acg acc tgg tac acc aac tcg gcc gct | 778 |
| Asn Asn Tyr Gly Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Ser Ala Ala |     |
| 215 220 225                                                     |     |
| cag gct gcg tat cgt aac tac atc aag gcg gtc atc tct cgg tac att | 826 |
| Gln Ala Ala Tyr Arg Asn Tyr Ile Lys Ala Val Ile Ser Arg Tyr Ile |     |
| 230 235 240                                                     |     |
| ggc tct cct gcg atc ttt gct tgg gag ttg gcc aat gag ccc cgc tgc | 874 |



## 31471

|                                                                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Gly Ser Pro Ala Ile Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg Cys                                              |      |
| 245                                250                                255                                260 |      |
| cat ggg tgc gac acc tct gtg atc tac aac tgg gtc tct agc acc agt                                              | 922  |
| His Gly Cys Asp Thr Ser Val Ile Tyr Asn Trp Val Ser Ser Thr Ser                                              |      |
| 265                                270                                275                                    |      |
| gca tac atc aag tct ctt gag cca aac cgc atg gtc tgc atc gga gat g                                            | 971  |
| Ala Tyr Ile Lys Ser Leu Glu Pro Asn Arg Met Val Cys Ile Gly Asp                                              |      |
| 280                                285                                290                                    |      |
| gtaagtcccc cctccgggga gctcgagatg acaaactcga aacctatgat tcaatcaaaa                                            | 1031 |
| ctaacattcg taatctgttc ag ag     ggc atg ggt ctc acc acc gga tcc gac                                          | 1082 |
| Glu Gly Met Gly Leu Thr Thr Gly Ser Asp                                                                      |      |
| 295                                300                                                                       |      |
| ggc agt tat ccc ttc caa tac acc gaa ggt acc gac ttc gag aag aac                                              | 1130 |
| Gly Ser Tyr Pro Phe Gln Tyr Thr Glu Gly Thr Asp Phe Glu Lys Asn                                              |      |
| 305                                310                                315                                    |      |
| ctg gcc atc ccc acc att gat ttc ggc acc ctg cac ttg tac cct agc                                              | 1178 |
| Leu Ala Ile Pro Thr Ile Asp Phe Gly Thr Leu His Leu Tyr Pro Ser                                              |      |
| 320                                325                                330                                    |      |
| agc t gtaagtcaaa gcctcttttc cagtccatat gcatacacag aacccttcc                                                  | 1232 |
| Ser                                                                                                          |      |
| 335                                                                                                          |      |
| actgactcgt acttttctcc gaatag gg     ggc gaa caa gac tcc tgg ggc agc                                          | 1284 |
| Trp Gly Glu Gln Asp Ser Trp Gly Ser                                                                          |      |
| 340                                                                                                          |      |
| acc tgg atc tcc gcc cac ggc caa gca tgc gtc aat gcc ggc aag ccc                                              | 1332 |
| Thr Trp Ile Ser Ala His Gly Gln Ala Cys Val Asn Ala Gly Lys Pro                                              |      |
| 345                                350                                355                                360 |      |
| tgc ctc ctg gaa gaa tat gga tcc acc aat cac tgc tct tcc gaa gct                                              | 1380 |

Cys Leu Leu Glu Glu Tyr Gly Ser Thr Asn His Cys Ser Ser Glu Ala  
 365 370 375

ccc tgg cag tcg acc gct ctc agc acg aac ggt atc gcg gct gac agt 1428  
 Pro Trp Gln Ser Thr Ala Leu Ser Thr Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ser  
 380 385 390

ttc tgg cag tac ggt gat acc tta agc acg ggc cag tcg ccg aat gac 1476  
 Phe Trp Gln Tyr Gly Asp Thr Leu Ser Thr Gly Gln Ser Pro Asn Asp  
 395 400 405

ggg tat acc att tac tac ggt agc agc gat tat acc tgc ttg gtg acg 1524  
 Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Thr Cys Leu Val Thr  
 410 415 420

aat cat att agc cag ttt cag tga 1548  
 Asn His Ile Ser Gln Phe Gln  
 425 430

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> Talaromyces leycettanus

<400> 2

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

Ala Gln Val Ala Asn Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Asn Tyr Ser Gly  
 20 25 30

Pro Thr Thr Cys Asn Pro Gly Trp Ser Cys Gln Tyr Leu Asn Pro Tyr  
 35 40 45

Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ala Thr Gln Thr Thr Thr Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60

Thr Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Thr Arg Thr Ser Thr Ser Thr  
 65 70 75 80

Thr Ser Thr Gln Gly Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Lys Asn  
 85 90 95

Gly Leu Lys Phe Thr Ile Asp Gly Lys Thr Ala Tyr Tyr Ala Gly Thr  
 100 105 110

Asn Thr Tyr Trp Leu Pro Phe Leu Thr Asn Asn Ala Asp Val Asp Leu  
 115 120 125

Val Met Ser His Leu Gln Gln Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp  
 130 135 140

Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln Pro Gly Ser Gly Thr Val Trp Phe  
 145 150 155 160

Gln Leu Leu Gln Asn Gly Gln Ala Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asn Gly  
 165 170 175

Leu Gln Arg Leu Asp Tyr Val Val Gln Ser Ala Glu Ala His Asp Ile  
 180 185 190

Lys Leu Ile Ile Asn Phe Val Asn Asn Trp Asn Asp Tyr Gly Gly Ile

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 195                                                             | 200 | 205     |
| Asn Ala Tyr Val Asn Asn Tyr Gly Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr |     |         |
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Asn Ser Ala Ala Gln Ala Ala Tyr Arg Asn Tyr Ile Lys Ala Val Ile |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Ser Arg Tyr Ile Gly Ser Pro Ala Ile Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn |     |         |
| 245                                                             | 250 | 255     |
| Glu Pro Arg Cys His Gly Cys Asp Thr Ser Val Ile Tyr Asn Trp Val |     |         |
| 260                                                             | 265 | 270     |
| Ser Ser Thr Ser Ala Tyr Ile Lys Ser Leu Glu Pro Asn Arg Met Val |     |         |
| 275                                                             | 280 | 285     |
| Cys Ile Gly Asp Glu Gly Met Gly Leu Thr Thr Gly Ser Asp Gly Ser |     |         |
| 290                                                             | 295 | 300     |
| Tyr Pro Phe Gln Tyr Thr Glu Gly Thr Asp Phe Glu Lys Asn Leu Ala |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Ile Pro Thr Ile Asp Phe Gly Thr Leu His Leu Tyr Pro Ser Ser Trp |     |         |
| 325                                                             | 330 | 335     |
| Gly Glu Gln Asp Ser Trp Gly Ser Thr Trp Ile Ser Ala His Gly Gln |     |         |
| 340                                                             | 345 | 350     |

Ala Cys Val Asn Ala Gly Lys Pro Cys Leu Leu Glu Glu Tyr Gly Ser  
 355 360 365

Thr Asn His Cys Ser Ser Glu Ala Pro Trp Gln Ser Thr Ala Leu Ser  
 370 375 380

Thr Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ser Phe Trp Gln Tyr Gly Asp Thr Leu  
 385 390 395 400

Ser Thr Gly Gln Ser Pro Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser  
 405 410 415

Ser Asp Tyr Thr Cys Leu Val Thr Asn His Ile Ser Gln Phe Gln  
 420 425 430

<210> 3

<211> 414

<212> PRT

<213> *Talaromyces leycettanus*

<400> 3

Gln Val Ala Asn Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Asn Tyr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Thr Thr Cys Asn Pro Gly Trp Ser Cys Gln Tyr Leu Asn Pro Tyr Tyr  
 20 25 30

Ser Gln Cys Leu Pro Ala Thr Gln Thr Thr Thr Leu Thr Thr Ser Thr  
 35 40 45

Lys Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Thr Arg Thr Ser Thr Ser Thr Thr  
 50 55 60

Ser Thr Gln Gly Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Lys Asn Gly  
 65 70 75 80

Leu Lys Phe Thr Ile Asp Gly Lys Thr Ala Tyr Tyr Ala Gly Thr Asn  
 85 90 95

Thr Tyr Trp Leu Pro Phe Leu Thr Asn Asn Ala Asp Val Asp Leu Val  
 100 105 110

Met Ser His Leu Gln Gln Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp Gly  
 115 120 125

Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln Pro Gly Ser Gly Thr Val Trp Phe Gln  
 130 135 140

Leu Leu Gln Asn Gly Gln Ala Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asn Gly Leu  
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Asp Tyr Val Val Gln Ser Ala Glu Ala His Asp Ile Lys  
 165 170 175

Leu Ile Ile Asn Phe Val Asn Asn Trp Asn Asp Tyr Gly Gly Ile Asn  
 180 185 190

Ala Tyr Val Asn Asn Tyr Gly Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn  
 195 200 205

Ser Ala Ala Gln Ala Ala Tyr Arg Asn Tyr Ile Lys Ala Val Ile Ser  
 210 215 220

Arg Tyr Ile Gly Ser Pro Ala Ile Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu  
 225 230 235 240

Pro Arg Cys His Gly Cys Asp Thr Ser Val Ile Tyr Asn Trp Val Ser  
 245 250 255

Ser Thr Ser Ala Tyr Ile Lys Ser Leu Glu Pro Asn Arg Met Val Cys  
 260 265 270

Ile Gly Asp Glu Gly Met Gly Leu Thr Thr Gly Ser Asp Gly Ser Tyr  
 275 280 285

Pro Phe Gln Tyr Thr Glu Gly Thr Asp Phe Glu Lys Asn Leu Ala Ile  
 290 295 300

Pro Thr Ile Asp Phe Gly Thr Leu His Leu Tyr Pro Ser Ser Trp Gly  
 305 310 315 320

Glu Gln Asp Ser Trp Gly Ser Thr Trp Ile Ser Ala His Gly Gln Ala  
 325 330 335

Cys Val Asn Ala Gly Lys Pro Cys Leu Leu Glu Glu Tyr Gly Ser Thr  
 340 345 350

Asn His Cys Ser Ser Glu Ala Pro Trp Gln Ser Thr Ala Leu Ser Thr  
 355 360 365

Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ser Phe Trp Gln Tyr Gly Asp Thr Leu Ser  
 370 375 380

Thr Gly Gln Ser Pro Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser Ser  
 385 390 395 400

Asp Tyr Thr Cys Leu Val Thr Asn His Ile Ser Gln Phe Gln  
 405 410

<210> 4

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 4

acacaactgg ggatccacca tgaagttgtc taccctcaat ttcct

45

<210> 5

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi



&lt;400&gt; 5

ccctctagat ctcgagcacg tcagtatcag cgaagcat

38

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1222

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Chaetomium virescens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(799)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (800)..(859)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (860)..(949)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (950)..(1007)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1008)..(1219)

&lt;400&gt; 6

atg aag gca atc ctc aca gcc ggg ctc gga ctg ctc tcc gca gtc cag

48

Met Lys Ala Ile Leu Thr Ala Gly Leu Gly Leu Leu Ser Ala Val Gln

1

5

10

15

gct ctt ccc tcg gcg aag gct gcc tct gcc acc acc aac ggc act cgc

96

Ala Leu Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ser Ala Thr Thr Asn Gly Thr Arg

20

25

30

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ttc acc gtc gac ggc aag acg ggc tac ttc gcg ggt acc aat tcg tac | 144 |
| Phe Thr Val Asp Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr |     |
| 35 40 45                                                        |     |
|                                                                 |     |
| tgg atc ggc ttc ctg acc aac aac aag gac atc gac acc act ctg gac | 192 |
| Trp Ile Gly Phe Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Asp Thr Thr Leu Asp |     |
| 50 55 60                                                        |     |
|                                                                 |     |
| cac atc tcg tcc tct ggt ctc aag atc ctg cgc gtc tgg ggc ttc aac | 240 |
| His Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp Gly Phe Asn |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
|                                                                 |     |
| gac gtc aac acc aag ccc agc gac ggc act gtc tgg tac cag ctc ctc | 288 |
| Asp Val Asn Thr Lys Pro Ser Asp Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu |     |
| 85 90 95                                                        |     |
|                                                                 |     |
| tcc ccg tcc ggt tca aag atc aac acg ggt gcc gac ggc ctg cag cgg | 336 |
| Ser Pro Ser Gly Ser Lys Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg |     |
| 100 105 110                                                     |     |
|                                                                 |     |
| ctc gac cat gta gtc aag tcc gct gag aag cgc ggc gtc aag ctg atc | 384 |
| Leu Asp His Val Val Lys Ser Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile |     |
| 115 120 125                                                     |     |
|                                                                 |     |
| atc aac ttc gtc aac aac tgg gac gat tac ggc ggc atg aac gcc tac | 432 |
| Ile Asn Phe Val Asn Asn Trp Asp Asp Tyr Gly Gly Met Asn Ala Tyr |     |
| 130 135 140                                                     |     |
|                                                                 |     |
| gtc aag gcc ttc ggc ggc acc aag gag ggt tgg tac acc aac gcc aag | 480 |
| Val Lys Ala Phe Gly Gly Thr Lys Glu Gly Trp Tyr Thr Asn Ala Lys |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
|                                                                 |     |
| gct cag cag cag tac aag aag tac atc aag gcc gtg gtc agc cgc tat | 528 |
| Ala Gln Gln Gln Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Ala Val Val Ser Arg Tyr |     |
| 165 170 175                                                     |     |
|                                                                 |     |
| gcc aag tcg cca gcc gtg ttt gcc tgg gag ctg gcg aac gag ccc cgc | 576 |

|                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------|------|
| Ala Lys Ser Pro Ala Val Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg  |      |
| 180 185 190                                                      |      |
| tgc aag gga tgc agc acc gat gtc atc tac aag tgg gcg acc gag atc  | 624  |
| Cys Lys Gly Cys Ser Thr Asp Val Ile Tyr Lys Trp Ala Thr Glu Ile  |      |
| 195 200 205                                                      |      |
| tcg gcg tac atc cgc aag ctg gat ccg agc cac atg atc acg ctc ggt  | 672  |
| Ser Ala Tyr Ile Arg Lys Leu Asp Pro Ser His Met Ile Thr Leu Gly  |      |
| 210 215 220                                                      |      |
| gat gag ggc ttt ggc ctg cct ggt gac acg acc tac ccg tac agc tac  | 720  |
| Asp Glu Gly Phe Gly Leu Pro Gly Asp Thr Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr  |      |
| 225 230 235 240                                                  |      |
| acc gag ggt gtc gat ttt gtc aag aac ttg ggc atc aag aac ttg gac  | 768  |
| Thr Glu Gly Val Asp Phe Val Lys Asn Leu Gly Ile Lys Asn Leu Asp  |      |
| 245 250 255                                                      |      |
| ttt gga aca ttc cat atg tat ccc gac agc t gtgcgttgac tccccgtccc  | 819  |
| Phe Gly Thr Phe His Met Tyr Pro Asp Ser                          |      |
| 260 265                                                          |      |
| ttcccccatc tattaccttt gagactgaca ggggagaaaag gg ggc gtc cca tac  | 873  |
| Trp Gly Val Pro Tyr                                              |      |
| 270                                                              |      |
| agc ttc ggc gag ggg tgg atc aag aac cat gcc gcg gct tgc aag cca  | 921  |
| Ser Phe Gly Glu Gly Trp Ile Lys Asn His Ala Ala Ala Cys Lys Pro  |      |
| 275 280 285                                                      |      |
| gcc ggc aag cct tgt ctt ttg gag gag t gtacgttcca ctaccagccc      | 969  |
| Ala Gly Lys Pro Cys Leu Leu Glu Glu                              |      |
| 290 295                                                          |      |
| tttcccagcc catgagcgaa atctgacagc ccgtgcag at ggt gcc gaa cac agc | 1024 |
| Tyr Gly Ala Glu His Ser                                          |      |
| 300                                                              |      |

tgc gac atc cag aag ccc tgg cag cag gcc tcg ctc gcg ctc gcc aag 1072  
 Cys Asp Ile Gln Lys Pro Trp Gln Gln Ala Ser Leu Ala Leu Ala Lys  
 305 310 315

gag ggc atg tcg gga gac ctc ttc tgg caa tgg ggt gac gcc ctg agc 1120  
 Glu Gly Met Ser Gly Asp Leu Phe Trp Gln Trp Gly Asp Ala Leu Ser  
 320 325 330

ttc ggc cag tca ccc aac gac ggc cac acg gtc tac tac ggc tcg gag 1168  
 Phe Gly Gln Ser Pro Asn Asp Gly His Thr Val Tyr Tyr Gly Ser Glu  
 335 340 345 350

ctt gct caa tgc ctg gtt aca gat cat gtt aag gag att aat gct tct 1216  
 Leu Ala Gln Cys Leu Val Thr Asp His Val Lys Glu Ile Asn Ala Ser  
 355 360 365

tcg taa 1222  
 Ser

<210> 7  
 <211> 367  
 <212> PRT  
 <213> Chaetomium virescens

<400> 7

Met Lys Ala Ile Leu Thr Ala Gly Leu Gly Leu Leu Ser Ala Val Gln  
 1 5 10 15

Ala Leu Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ser Ala Thr Thr Asn Gly Thr Arg  
 20 25 30

Phe Thr Val Asp Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr

35

40

45

Trp Ile Gly Phe Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Asp Thr Thr Leu Asp  
 50 55 60

His Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp Gly Phe Asn  
 65 70 75 80

Asp Val Asn Thr Lys Pro Ser Asp Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu  
 85 90 95

Ser Pro Ser Gly Ser Lys Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg  
 100 105 110

Leu Asp His Val Val Lys Ser Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile  
 115 120 125

Ile Asn Phe Val Asn Asn Trp Asp Asp Tyr Gly Gly Met Asn Ala Tyr  
 130 135 140

Val Lys Ala Phe Gly Gly Thr Lys Glu Gly Trp Tyr Thr Asn Ala Lys  
 145 150 155 160

Ala Gln Gln Gln Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Ala Val Val Ser Arg Tyr  
 165 170 175

Ala Lys Ser Pro Ala Val Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg  
 180 185 190

Cys Lys Gly Cys Ser Thr Asp Val Ile Tyr Lys Trp Ala Thr Glu Ile  
 195 200 205

Ser Ala Tyr Ile Arg Lys Leu Asp Pro Ser His Met Ile Thr Leu Gly  
 210 215 220

Asp Glu Gly Phe Gly Leu Pro Gly Asp Thr Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr  
 225 230 235 240

Thr Glu Gly Val Asp Phe Val Lys Asn Leu Gly Ile Lys Asn Leu Asp  
 245 250 255

Phe Gly Thr Phe His Met Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Val Pro Tyr Ser  
 260 265 270

Phe Gly Glu Gly Trp Ile Lys Asn His Ala Ala Ala Cys Lys Pro Ala  
 275 280 285

Gly Lys Pro Cys Leu Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Glu His Ser Cys Asp  
 290 295 300

Ile Gln Lys Pro Trp Gln Gln Ala Ser Leu Ala Leu Ala Lys Glu Gly  
 305 310 315 320

Met Ser Gly Asp Leu Phe Trp Gln Trp Gly Asp Ala Leu Ser Phe Gly  
 325 330 335

Gln Ser Pro Asn Asp Gly His Thr Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Ala

340

345

350

Gln Cys Leu Val Thr Asp His Val Lys Glu Ile Asn Ala Ser Ser

355

360

365

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 350

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chaetomium virescens

&lt;400&gt; 8

Leu Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ser Ala Thr Thr Asn Gly Thr Arg Phe

1

5

10

15

Thr Val Asp Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr Trp

20

25

30

Ile Gly Phe Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Asp Thr Thr Leu Asp His

35

40

45

Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Ile Leu Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp

50

55

60

Val Asn Thr Lys Pro Ser Asp Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu Ser

65

70

75

80

Pro Ser Gly Ser Lys Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg Leu

85

90

95

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Asp His Val Val Lys Ser Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile Ile |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| Asn Phe Val Asn Asn Trp Asp Asp Tyr Gly Gly Met Asn Ala Tyr Val |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Lys Ala Phe Gly Gly Thr Lys Glu Gly Trp Tyr Thr Asn Ala Lys Ala |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Gln Gln Gln Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Lys Ser Pro Ala Val Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg Cys |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Lys Gly Cys Ser Thr Asp Val Ile Tyr Lys Trp Ala Thr Glu Ile Ser |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ala Tyr Ile Arg Lys Leu Asp Pro Ser His Met Ile Thr Leu Gly Asp |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Glu Gly Phe Gly Leu Pro Gly Asp Thr Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr Thr |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Glu Gly Val Asp Phe Val Lys Asn Leu Gly Ile Lys Asn Leu Asp Phe |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Gly Thr Phe His Met Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Val Pro Tyr Ser Phe |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |



Gly Glu Gly Trp Ile Lys Asn His Ala Ala Ala Cys Lys Pro Ala Gly  
 260 265 270

Lys Pro Cys Leu Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Glu His Ser Cys Asp Ile  
 275 280 285

Gln Lys Pro Trp Gln Gln Ala Ser Leu Ala Leu Ala Lys Glu Gly Met  
 290 295 300

Ser Gly Asp Leu Phe Trp Gln Trp Gly Asp Ala Leu Ser Phe Gly Gln  
 305 310 315 320

Ser Pro Asn Asp Gly His Thr Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Ala Gln  
 325 330 335

Cys Leu Val Thr Asp His Val Lys Glu Ile Asn Ala Ser Ser  
 340 345 350

<210> 9

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 9

acacaactgg g gatccacca tgaaggcaat cctcacagcc

40

<210> 10  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mồi

<400> 10  
 ccctctagat ctcgagtgcg tatcacggga cttcaga

37

<210> 11  
 <211> 1203  
 <212> ADN  
 <213> *Sordaria macrospora*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(781)

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (782)..(838)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (839)..(928)

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (929)..(988)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (989)..(1200)

<400> 11

atg aag tcc ttg ttc acc ctc gcc ctc ggc ttg cta tca ttg gtc tca 48  
Met Lys Ser Leu Phe Thr Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ser Leu Val Ser  
1 5 10 15

gct gcg cct ccc act gtc aat ggc aca cgc ttc tcc atc gac ggc aaa 96  
Ala Ala Pro Pro Thr Val Asn Gly Thr Arg Phe Ser Ile Asp Gly Lys  
20 25 30

acg ggg tac ttt gcc ggt acc aac tcg tac tgg atc ggc ttc cta acc 144  
Thr Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr Trp Ile Gly Phe Leu Thr  
35 40 45

aaa aac cga gat gtc gac acc gtc ctt gac cac atc tcc tcc tcc gga 192  
Lys Asn Arg Asp Val Asp Thr Val Leu Asp His Ile Ser Ser Ser Gly  
50 55 60

ctc aaa atc ctg cgc atc tgg ggc ttc aac gac gtc acc cgc aag cca 240  
Leu Lys Ile Leu Arg Ile Trp Gly Phe Asn Asp Val Thr Arg Lys Pro  
65 70 75 80

gcc tcc ggc acc gtg tgg tac cag ctc ctc tcc tcg tcc ggt tcc cag 288  
Ala Ser Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu Ser Ser Ser Gly Ser Gln  
85 90 95

atc aac acc ggt gcc gat ggc ctg cag cgc ctg gac tac gtc gtc cag 336  
Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg Leu Asp Tyr Val Val Gln  
100 105 110

tcc gcc gaa aag cgt ggt gtc aag ctc atc att aac ttt gtc aac aac 384  
Ser Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile Ile Asn Phe Val Asn Asn  
115 120 125

tgg agc gac tac ggc ggc atg cca gcc tac gtg act gca ttc gga ggt 432  
Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Met Pro Ala Tyr Val Thr Ala Phe Gly Gly  
130 135 140

tcc caq gag agc tgg tac acc aac agt cgg gcg cag gcg cag tac aag 480

|            |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|---------|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser        | Gln     | Glu | Ser | Trp | Tyr        | Thr        | Asn        | Ser        | Arg | Ala | Gln | Ala | Gln | Tyr | Lys |     |     |
| 145        |         |     |     |     |            | 150        |            |            |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gcc        | tac     | att | gcc | gct | gtt        | gtc        | aac        | cgc        | tat | atc | aac | tct | tcc | gct | gtc |     | 528 |
| Ala        | Tyr     | Ile | Ala | Ala | Val        | Val        | Asn        | Arg        | Tyr | Ile | Asn | Ser | Ser | Ala | Val |     |     |
|            |         |     |     | 165 |            |            |            |            | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ttt        | gcc     | tgg | gag | ctg | gcg        | aac        | gag        | ccc        | cgc | tgc | aag | gga | tgt | agc | act |     | 576 |
| Phe        | Ala     | Trp | Glu | Leu | Ala        | Asn        | Glu        | Pro        | Arg | Cys | Lys | Gly | Cys | Ser | Thr |     |     |
|            |         |     | 180 |     |            |            |            | 185        |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gat        | gtt     | att | tac | aag | tgg        | gca        | act        | gac        | atc | tca | gct | tac | atc | cgc | agt |     | 624 |
| Asp        | Val     | Ile | Tyr | Lys | Trp        | Ala        | Thr        | Asp        | Ile | Ser | Ala | Tyr | Ile | Arg | Ser |     |     |
|            |         |     | 195 |     |            |            |            | 200        |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ttg        | gat     | tgc | aac | cac | atg        | atc        | acc        | ctc        | gga | gac | gaa | ggg | ttt | gga | ctt |     | 672 |
| Leu        | Asp     | Cys | Asn | His | Met        | Ile        | Thr        | Leu        | Gly | Asp | Glu | Gly | Phe | Gly | Leu |     |     |
|            |         |     | 210 |     |            |            |            | 215        |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ccc        | ggg     | gcg | acc | agc | tat        | ccg        | tat        | caa        | acc | agc | gaa | ggc | gtg | gat | ttt |     | 720 |
| Pro        | Gly     | Ala | Thr | Ser | Tyr        | Pro        | Tyr        | Gln        | Thr | Ser | Glu | Gly | Val | Asp | Phe |     |     |
| 225        |         |     |     | 230 |            |            |            |            |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gtc        | aag     | aat | ctg | gcc | att        | aag        | aac        | ttg        | gat | ttt | ggc | act | ttc | cac | ttc |     | 768 |
| Val        | Lys     | Asn | Leu | Ala | Ile        | Lys        | Asn        | Leu        | Asp | Phe | Gly | Thr | Phe | His | Phe |     |     |
|            |         |     |     | 245 |            |            |            |            |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| tat        | ccg     | caa | agc | t   | gtacgtaaca | tgaaactccc | atgtcaggga | atcaacactg |     |     |     |     |     |     |     |     | 821 |
| Tyr        | Pro     | Gln | Ser |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|            |         |     | 260 |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| accgtgacta | ttcttag | gg  | ggg | gtg | ggc        | aat        | gct        | gtt        | ggt | gca | gct | tgg |     |     |     |     | 870 |
|            |         |     |     |     |            | Trp        | Gly        | Val        | Gly | Asn | Ala | Val | Gly | Ala | Ala | Trp |     |
|            |         |     |     |     |            |            |            |            |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| <br>       |         |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| atc        | aaa     | gac | cat | gcc | tcg        | gct        | tgc        | aag        | aag | gcc | ggg | aag | cct | tgt | cta |     | 918 |
| Ile        | Lys     | Asp | His | Ala | Ser        | Ala        | Cys        | Lys        | Lys | Ala | Gly | Lys | Pro | Cys | Leu |     |     |
|            |         |     |     | 275 |            |            |            | 280        |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |

ttt gag gag t gtaagtggat gctgtgagcc agtctgattt gcaggtagct 968  
Phe Glu Glu  
290

aacgaatgct attcttccag at ggc acc tca acc gat cac tgc acc atc gag 1020  
Tyr Gly Thr Ser Thr Asp His Cys Thr Ile Glu  
295 300

cga cct tgg caa caa gcc tcc ctc caa gct gcc acg gag ggc atg gca 1068  
Arg Pro Trp Gln Gln Ala Ser Leu Gln Ala Ala Thr Glu Gly Met Ala  
305 310 315

gct gac ttg ttt tgg caa tgg gga gat aat ctg agc acg ggg cag aca 1116  
Ala Asp Leu Phe Trp Gln Trp Gly Asp Asn Leu Ser Thr Gly Gln Thr  
320 325 330

cac aat gac ggg aac acg atc tat tat gga tca gcc gat gcc act tgc 1164  
His Asn Asp Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser Ala Asp Ala Thr Cys  
335 340 345

ttg att acc gag cat gtc agg gcc atc aac tcc ctc tag 1203  
Leu Ile Thr Glu His Val Arg Ala Ile Asn Ser Leu  
350 355 360

<210> 12

<211> 361

<212> PRT

<213> Sordaria macrospora

<400> 12

Met Lys Ser Leu Phe Thr Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ser Leu Val Ser  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Thr Val Asn Gly Thr Arg Phe Ser Ile Asp Gly Lys

20

25

30

Thr Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr Trp Ile Gly Phe Leu Thr  
 35 40 45

Lys Asn Arg Asp Val Asp Thr Val Leu Asp His Ile Ser Ser Ser Gly  
 50 55 60

Leu Lys Ile Leu Arg Ile Trp Gly Phe Asn Asp Val Thr Arg Lys Pro  
 65 70 75 80

Ala Ser Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu Ser Ser Ser Gly Ser Gln  
 85 90 95

Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg Leu Asp Tyr Val Val Gln  
 100 105 110

Ser Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile Ile Asn Phe Val Asn Asn  
 115 120 125

Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Met Pro Ala Tyr Val Thr Ala Phe Gly Gly  
 130 135 140

Ser Gln Glu Ser Trp Tyr Thr Asn Ser Arg Ala Gln Ala Gln Tyr Lys  
 145 150 155 160

Ala Tyr Ile Ala Ala Val Val Asn Arg Tyr Ile Asn Ser Ser Ala Val  
 165 170 175

Phe Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg Cys Lys Gly Cys Ser Thr  
 180 185 190

Asp Val Ile Tyr Lys Trp Ala Thr Asp Ile Ser Ala Tyr Ile Arg Ser  
 195 200 205

Leu Asp Cys Asn His Met Ile Thr Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly Leu  
 210 215 220

Pro Gly Ala Thr Ser Tyr Pro Tyr Gln Thr Ser Glu Gly Val Asp Phe  
 225 230 235 240

Val Lys Asn Leu Ala Ile Lys Asn Leu Asp Phe Gly Thr Phe His Phe  
 245 250 255

Tyr Pro Gln Ser Trp Gly Val Gly Asn Ala Val Gly Ala Ala Trp Ile  
 260 265 270

Lys Asp His Ala Ser Ala Cys Lys Lys Ala Gly Lys Pro Cys Leu Phe  
 275 280 285

Glu Glu Tyr Gly Thr Ser Thr Asp His Cys Thr Ile Glu Arg Pro Trp  
 290 295 300

Gln Gln Ala Ser Leu Gln Ala Ala Thr Glu Gly Met Ala Ala Asp Leu  
 305 310 315 320

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Asn Leu Ser Thr Gly Gln Thr His Asn Asp

325

330

335

Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser Ala Asp Ala Thr Cys Leu Ile Thr  
 340 345 350

Glu His Val Arg Ala Ile Asn Ser Leu  
 355 360

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 344

&lt;212&gt; PRT

<213> *Sordaria macrospora*

&lt;400&gt; 13

Ala Pro Pro Thr Val Asn Gly Thr Arg Phe Ser Ile Asp Gly Lys Thr  
 1 5 10 15

Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Ser Tyr Trp Ile Gly Phe Leu Thr Lys  
 20 25 30

Asn Arg Asp Val Asp Thr Val Leu Asp His Ile Ser Ser Ser Gly Leu  
 35 40 45

Lys Ile Leu Arg Ile Trp Gly Phe Asn Asp Val Thr Arg Lys Pro Ala  
 50 55 60

Ser Gly Thr Val Trp Tyr Gln Leu Leu Ser Ser Ser Gly Ser Gln Ile  
 65 70 75 80



|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Arg Leu Asp Tyr Val Val Gln Ser |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
|                                                                 |     |     |     |
| Ala Glu Lys Arg Gly Val Lys Leu Ile Ile Asn Phe Val Asn Asn Trp |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
|                                                                 |     |     |     |
| Ser Asp Tyr Gly Gly Met Pro Ala Tyr Val Thr Ala Phe Gly Gly Ser |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
|                                                                 |     |     |     |
| Gln Glu Ser Trp Tyr Thr Asn Ser Arg Ala Gln Ala Gln Tyr Lys Ala |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
|                                                                 |     |     |     |
| Tyr Ile Ala Ala Val Val Asn Arg Tyr Ile Asn Ser Ser Ala Val Phe |     |     |     |
|                                                                 | 145 | 150 | 155 |
|                                                                 |     |     |     |
| Ala Trp Glu Leu Ala Asn Glu Pro Arg Cys Lys Gly Cys Ser Thr Asp |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
|                                                                 |     |     |     |
| Val Ile Tyr Lys Trp Ala Thr Asp Ile Ser Ala Tyr Ile Arg Ser Leu |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
|                                                                 |     |     |     |
| Asp Cys Asn His Met Ile Thr Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly Leu Pro |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
|                                                                 |     |     |     |
| Gly Ala Thr Ser Tyr Pro Tyr Gln Thr Ser Glu Gly Val Asp Phe Val |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
|                                                                 |     |     |     |
| Lys Asn Leu Ala Ile Lys Asn Leu Asp Phe Gly Thr Phe His Phe Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 225 | 230 | 235 |
|                                                                 |     |     | 240 |

Pro Gln Ser Trp Gly Val Gly Asn Ala Val Gly Ala Ala Trp Ile Lys  
 245 250 255

Asp His Ala Ser Ala Cys Lys Lys Ala Gly Lys Pro Cys Leu Phe Glu  
 260 265 270

Glu Tyr Gly Thr Ser Thr Asp His Cys Thr Ile Glu Arg Pro Trp Gln  
 275 280 285

Gln Ala Ser Leu Gln Ala Ala Thr Glu Gly Met Ala Ala Asp Leu Phe  
 290 295 300

Trp Gln Trp Gly Asp Asn Leu Ser Thr Gly Gln Thr His Asn Asp Gly  
 305 310 315 320

Asn Thr Ile Tyr Tyr Gly Ser Ala Asp Ala Thr Cys Leu Ile Thr Glu  
 325 330 335

His Val Arg Ala Ile Asn Ser Leu  
 340

<210> 14

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

&lt;400&gt; 14

acacaactgg ggatccacca tgaagtcctt gttcacccctc gcc

43

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Đoạn mỗi

&lt;400&gt; 15

ccctctagat ctcgaggtac gcagccacgg cgaca

35

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 309

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus sp.

&lt;400&gt; 16

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

1

5

10

15

Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr

20

25

30

Lys Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ile Glu Gly Ile Ala Asn Thr Gly Ala

35

40

45

Asn Thr Val Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Thr Lys Asp

50

55

60

Asp Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His  
 65 70 75 80

Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile  
 85 90 95

Ala Ser Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Arg Ser Ala  
 100 105 110

Leu Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp  
 115 120 125

Phe Gly Ser Trp Glu Gly Asp Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala  
 130 135 140

Ile Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Met Val Asp  
 145 150 155 160

Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Arg  
 165 170 175

Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His  
 180 185 190

Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Gln Val Arg Thr Asn Ile  
 195 200 205

Asp Arg Val Leu Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly

210

215

220

His Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr  
 225 230 235 240

Ser Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn  
 245 250 255

Gly Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn  
 260 265 270

Asn Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu  
 275 280 285

Arg Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Gly Gly Gly Ser Asp  
 290 295 300

Gly Gly Thr Ser Pro  
 305

<210> 17  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Caldicellulosiruptor saccharolyticus

<400> 17

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

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Thr Ser Asn Asp  
 20 25 30

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

His Cys Trp Tyr Arg Asp Arg Leu Asp Thr Ala Leu Arg Gly Ile Arg  
 50 55 60

Ser Trp Gly Met Asn Ser Val Arg Val Val Leu Ser Asn Gly Tyr Arg  
 65 70 75 80

Trp Thr Lys Ile Pro Ala Ser Glu Val Ala Asn Ile Ile Ser Leu Ser  
 85 90 95

Arg Ser Leu Gly Phe Lys Ala Ile Ile Leu Glu Val His Asp Thr Thr  
 100 105 110

Gly Tyr Gly Glu Asp Gly Ala Ala Cys Ser Leu Ala Gln Ala Val Glu  
 115 120 125

Tyr Trp Lys Glu Ile Lys Ser Val Leu Asp Gly Asn Glu Asp Phe Val  
 130 135 140

Ile Ile Asn Ile Gly Asn Glu Pro Tyr Gly Asn Asn Asn Tyr Gln Asn  
 145 150 155 160

Trp Val Asn Asp Thr Lys Asn Ala Ile Lys Ala Leu Arg Asp Ala Gly  
 165 170 175

Phe Lys His Thr Ile Met Val Asp Ala Pro Asn Trp Gly Gln Asp Trp  
 180 185 190

Ser Asn Thr Met Arg Asp Asn Ala Gln Ser Ile Met Glu Ala Asp Pro  
 195 200 205

Leu Arg Asn Leu Val Phe Ser Ile His Met Tyr Gly Val Tyr Asn Thr  
 210 215 220

Ala Ser Lys Val Glu Glu Tyr Ile Lys Ser Phe Val Asp Lys Gly Leu  
 225 230 235 240

Pro Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His Gln His Thr Asp Gly Asp Pro  
 245 250 255

Asp Glu Glu Ala Ile Val Arg Tyr Ala Lys Gln Tyr Lys Ile Gly Leu  
 260 265 270

Phe Ser Trp Ser Trp Cys Gly Asn Ser Ser Tyr Val Gly Tyr Leu Asp  
 275 280 285

Met Val Asn Asn Trp Asp Pro Asn Asn Pro Thr Pro Trp Gly Gln Trp  
 290 295 300

Tyr Lys Thr Asn Ala Ile Gly Thr Ser Ser Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
 305 310 315 320

# 31471

Thr Val Thr Pro Thr Pro Pro Pro Arg Gln His Gln His Arg Gln  
 325 330 335

<210> 18  
 <211> 292  
 <212> PRT  
 <213> Caldicellulosiruptor saccharolyticus

<400> 18

Ala Thr Ser Asn Asp Gly Val Val Lys Ile Asp Thr Ser Thr Leu Ile  
 1 5 10 15

Gly Thr Asn His Ala His Cys Trp Tyr Arg Asp Arg Leu Asp Thr Ala  
 20 25 30

Leu Arg Gly Ile Arg Ser Trp Gly Met Asn Ser Val Arg Val Val Leu  
 35 40 45

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

Ile Ile Ser Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Lys Ala Ile Ile Leu Glu  
 65 70 75 80

Val His Asp Thr Thr Gly Tyr Gly Glu Asp Gly Ala Ala Cys Ser Leu  
 85 90 95

Ala Gln Ala Val Glu Tyr Trp Lys Glu Ile Lys Ser Val Leu Asp Gly  
 100 105 110



Asn Glu Asp Phe Val Ile Ile Asn Ile Gly Asn Glu Pro Tyr Gly Asn  
 115 120 125

Asn Asn Tyr Gln Asn Trp Val Asn Asp Thr Lys Asn Ala Ile Lys Ala  
 130 135 140

Leu Arg Asp Ala Gly Phe Lys His Thr Ile Met Val Asp Ala Pro Asn  
 145 150 155 160

Trp Gly Gln Asp Trp Ser Asn Thr Met Arg Asp Asn Ala Gln Ser Ile  
 165 170 175

Met Glu Ala Asp Pro Leu Arg Asn Leu Val Phe Ser Ile His Met Tyr  
 180 185 190

Gly Val Tyr Asn Thr Ala Ser Lys Val Glu Glu Tyr Ile Lys Ser Phe  
 195 200 205

Val Asp Lys Gly Leu Pro Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His Gln His  
 210 215 220

Thr Asp Gly Asp Pro Asp Glu Glu Ala Ile Val Arg Tyr Ala Lys Gln  
 225 230 235 240

Tyr Lys Ile Gly Leu Phe Ser Trp Ser Trp Cys Gly Asn Ser Ser Tyr  
 245 250 255

Val Gly Tyr Leu Asp Met Val Asn Asn Trp Asp Pro Asn Asn Pro Thr

260

265

270

Pro Trp Gly Gln Trp Tyr Lys Thr Asn Ala Ile Gly Thr Ser Ser Thr  
 275 280 285

Pro Thr Pro Thr  
 290

<210> 19

<211> 418

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 19

Ala Val Leu Gln Pro Val Pro Arg Ala Ser Ser Phe Val Thr Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr  
 20 25 30

Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser  
 35 40 45

Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp  
 50 55 60

Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe  
 65 70 75 80

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|
| Gln | Lys | Leu | Ser | Ala | Thr | Gly | Ser | Thr | Ile | Asn | Thr | Gly | Ala | Asp | Gly |  |  |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Leu | Gln | Thr | Leu | Asp | Tyr | Val | Val | Gln | Ser | Ala | Glu | Gln | His | Asn | Leu |  |  |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Lys | Leu | Ile | Ile | Pro | Phe | Val | Asn | Asn | Trp | Ser | Asp | Tyr | Gly | Gly | Ile |  |  |     |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Asn | Ala | Tyr | Val | Asn | Ala | Phe | Gly | Gly | Asn | Ala | Thr | Thr | Trp | Tyr | Thr |  |  |     |
|     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Asn | Thr | Ala | Ala | Gln | Thr | Gln | Tyr | Arg | Lys | Tyr | Val | Gln | Ala | Val | Val |  |  |     |
|     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |  |  | 160 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Ser | Arg | Tyr | Ala | Asn | Ser | Thr | Ala | Ile | Phe | Ala | Trp | Glu | Leu | Gly | Asn |  |  |     |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Glu | Pro | Arg | Cys | Asn | Gly | Cys | Ser | Thr | Asp | Val | Ile | Val | Gln | Trp | Ala |  |  |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Thr | Ser | Val | Ser | Gln | Tyr | Val | Lys | Ser | Leu | Asp | Ser | Asn | His | Leu | Val |  |  |     |
|     |     |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Thr | Leu | Gly | Asp | Glu | Gly | Leu | Gly | Leu | Ser | Thr | Gly | Asp | Gly | Ala | Tyr |  |  |     |
|     |     |     | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
| Pro | Tyr | Thr | Tyr | Gly | Glu | Gly | Thr | Asp | Phe | Ala | Lys | Asn | Val | Gln | Ile |  |  |     |
|     |     |     | 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |  |  | 240 |

Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly  
 245 250 255

Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala  
 260 265 270

Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys Val Phe Glu Glu Tyr Gly Ala Gln  
 275 280 285

Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr  
 290 295 300

Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe  
 305 310 315 320

Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn  
 325 330 335

Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn  
 340 345 350

Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro Val Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ser  
 355 360 365

Ser Arg Thr Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ser Cys Ser Pro  
 370 375 380

Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Thr Cys Cys  
 385 390 395 400

Ala Gln Gly Thr Cys Ile Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 405 410 415

Asn Thr

<210> 20  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei

<400> 20

Ala Val Leu Gln Pro Val Pro Arg Ala Ser Ser Phe Val Thr Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr  
 20 25 30

Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser  
 35 40 45

Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp  
 50 55 60

Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe  
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly  
                     85                    90                    95

Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu  
                     100                    105                    110

Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile  
                     115                    120                    125

Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr  
                     130                    135                    140

Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val  
                     145                    150                    155                    160

Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn  
                     165                    170                    175

Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala  
                     180                    185                    190

Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val  
                     195                    200                    205

Thr Leu Gly Asp Glu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr  
                     210                    215                    220

Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr Asp Phe Ala Lys Asn Val Gln Ile

225

230

235

240

Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly  
 245 250 255

Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala  
 260 265 270

Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys Val Phe Glu Glu Tyr Gly Ala Gln  
 275 280 285

Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr  
 290 295 300

Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe  
 305 310 315 320

Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn  
 325 330 335

Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn  
 340 345 350

Gly Gly Thr  
 355