



(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)



1-0034843

(51)⁷ A23K 1/02; A23K 1/18; A23K 1/165; (13) B
A23K 1/00; A23K 1/14

(21) 1-2014-01300

(22) 09/11/2012

(86) PCT/EP2012/072307 09/11/2012

(87) WO2013/068550 16/05/2013

(30) 11188480.5 09/11/2011 EP

(45) 27/02/2023 419

(43) 25/09/2014 318A

(73) PURATOS N.V. (BE)

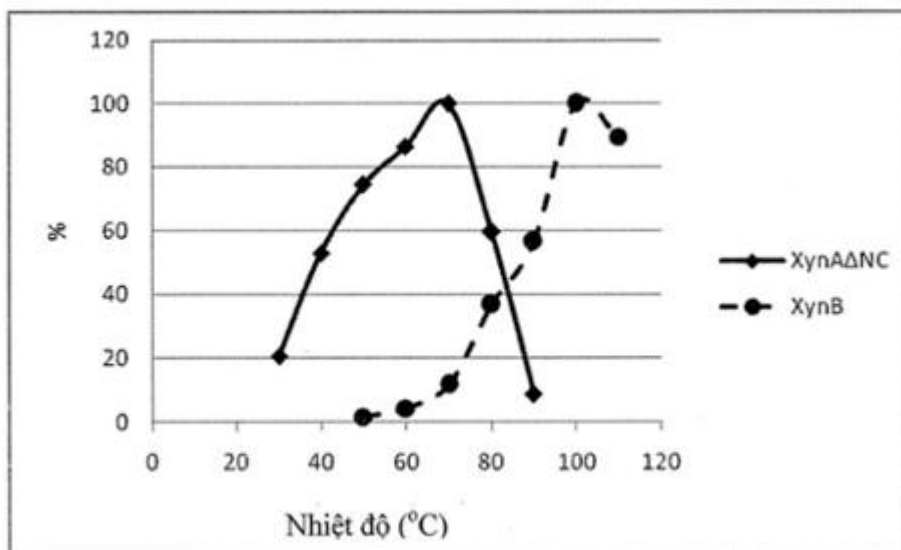
Industrialaan 25, B-1702 GROOT-BIJGAARDEN, BELGIUM

(72) BRUYER Denis (BE); GEORIS Jacques (BE); DORGE Valérie (BE).

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

(54) THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CÓ BỔ SUNG XYLANAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến thức ăn cho động vật có bổ sung xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao. Phương pháp sản xuất thức ăn cho động vật này cũng được đề xuất.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thức ăn cho động vật có bổ sung xylanaza bền nhiệt độ cao và chịu nhiệt độ cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các xylanaza đã được sử dụng làm các chất phụ gia thức ăn trong vài năm qua. Thực tế là một số cho dù không phải là tất cả các xylanaza đã được chỉ ra là cải thiện một hoặc cả hai chỉ số tăng thể trọng tuyệt đối của động vật (BWG) và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) của một thức ăn được đưa ra.

Các xylanaza được sử dụng trong thức ăn có thể, ví dụ, cho phép các nhà dinh dưỡng học giảm bớt các yêu cầu năng lượng trong các khẩu phần ăn mà không ảnh hưởng tới các hiệu suất chăn nuôi động vật.

Các xylanaza làm tăng năng lượng có thể chuyển hóa được hoặc năng lượng thực của các thành phần nguyên liệu và do đó nâng cao tổng năng lượng có thể chuyển hóa được hoặc tổng năng lượng thực của các khẩu phần thức ăn. Do đó, các hiệu suất chăn nuôi có thể được duy trì với năng lượng nguyên liệu ít hơn trong các khẩu phần ăn rẻ tiền hơn (ít chất béo/dầu hơn; ít xơ hơn).

Một lợi ích có thể có liên quan tới việc sử dụng xylanaza sự giải phóng tốt hơn của (vi) chất dinh dưỡng bị kẹt trong các thành tế bào của thức ăn. Sự kẹt như vậy là do sự có mặt của các polysacarit không tinh bột chống sự tiêu hóa bởi động vật.

Để có hiệu quả, các xylanaza được sử dụng làm các chất phụ gia thức ăn cần phải có được cả tính bền lẫn có hoạt tính ở độ pH và nhiệt độ gần giống như các điều kiện trong đường dạ dày ruột của động vật.

WO 95/29997 mô tả các xylanaza bền nhiệt và đề cập tới việc kết hợp chúng vào thức ăn cho động vật. Độ bền nhiệt được xác định là sức bền theo phút ở 95°C, kết hợp với khả năng thủy phân tiếp sau dung dịch của arabinoxylan lúa

mì ở 40°C. Tuy nhiên, sau năm phút xử lý nhiệt, các xylanaza được đề cập đã mất đi đáng kể hoạt tính của chúng.

Một vài loài và chủng *Thermotoga* đã được đề xuất để tạo ra một hoặc nhiều endoxylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt. *Thermotoga maritima* sản xuất ra hai endoxylanaza bền nhiệt, được ký hiệu là XynA và XynB. XynA và XynB xuất hiện dưới dạng các protein có các khối lượng phân tử biểu kiến khoảng 120 và 40 kDa. Hoạt tính tối đa ở độ pH tối ưu (độ pH 6,2 và độ pH 5,4 lần lượt cho XynA và XynB) được đo ở khoảng 92°C cho XynA và ở khoảng 105°C cho XynB (Winterhalter and Liebl, 1995, Appl. Env. Microbiol., 61, 1810-1815).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế là đề xuất thức ăn cho động vật có bổ sung thành phần chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao.

Tốt hơn là, nhiệt độ tối ưu của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần đã nêu này là lớn hơn 80°C, tốt hơn nữa là lớn hơn 85°C, cũng tốt hơn nữa là lớn hơn 90°C.

Tốt hơn là, tỷ số hoạt tính giữa hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này ở nhiệt độ tối ưu và ở 40°C là lớn hơn 10, tốt hơn nữa là lớn hơn 20.

Có lợi, nếu trên 70% hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là chịu tới 30 phút gia nhiệt ở 90°C.

Tốt hơn nữa là, xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao có độ tương đồng trên 80% và/hoặc độ tương tự trên 90% với xylanaza được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, các axit amin 21-332 của trình tự SEQ.ID.NO:1, của trình tự SEQ.ID.NO:2, của trình tự SEQ.ID.NO:3, của trình tự SEQ.ID.NO:4 và của trình tự SEQ.ID.NO:5 và có khả năng là thức ăn cho động vật này chứa xylanaza (tinh khiết) chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao nêu trên với lượng nằm trong khoảng từ 0,08 đến 40mg/kg.

Có thể là, thức ăn cho động vật này ở dạng lỏng và tốt hơn là chứa xylanaza (tinh khiết) chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao với lượng nằm trong khoảng từ 0,08 đến 40mg/l.

Theo cách khác, thức ăn cho động vật này được chọn từ nhóm gồm thức ăn ủ chua, thức ăn dạng hạt và thức ăn dạng bột hỗn hợp.

Tốt hơn là, thức ăn cho động vật bao gồm ít nhất là 50% (tính theo khối lượng khô) nguyên liệu thực vật, tốt hơn nữa là nó được chọn từ nhóm gồm các loại ngũ cốc, các loại đậu, mật đường củ cải, bột khoai tây và bột đậu phộng.

Tốt hơn là, thức ăn cho động vật bao gồm ít nhất là 5% (khối lượng khô) các protein và/hoặc ít nhất là 2% (khối lượng khô) chất béo.

Một khía cạnh của sáng chế là đề cập đến thức ăn cho động vật bao gồm từ 0,08 tới 40mg/kg (tính theo khối lượng khô) là polypeptit độ tương đồng trên 80% và/hoặc độ tương tự trên 90% với polypeptit được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, các axit amin 21-332 của trình tự SEQ.ID.NO:1, của trình tự SEQ.ID.NO:2, của trình tự SEQ.ID.NO:3, của trình tự SEQ.ID.NO:4 và của trình tự SEQ.ID.NO:5.

Một khía cạnh khác được đề cập là việc sử dụng (không nhằm mục đích trị liệu) thức ăn cho động vật để cải thiện mức tăng trọng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn ở động vật, tốt hơn là động vật có xương sống không thuộc loài nhai lại hoặc loài giấp xác và tốt hơn nữa là cá, lợn hoặc gia cầm.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn cho động vật bao gồm các bước:

- a) lựa chọn thức ăn chứa hemixenluloza;
- b) bổ sung thành phần chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao.

Tốt hơn là, trên 70% hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần được bổ sung ở bước b) của phương pháp này là chịu tới 30 phút gia nhiệt thành phần này ở 90°C và/hoặc nhiệt độ tối ưu của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là lớn hơn 80°C (tốt hơn là lớn hơn 85°C, tốt hơn nữa là lớn hơn 90°C).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện trình tự axit amin của XynB của xylanaza thuộc họ *Thermotoga maritima* MSB8. Peptit tín hiệu được gạch chân.

Fig.2 thể hiện các gel SDS-polyacrylamit đã được nhuộm bằng Coomassie xanh da trời của các endoxylanaza được thu hồi sau các bước tinh chế kết tiếp. Fig.2a: XynAÄNC; Fig.2b: XynB.

Fig.3 thể hiện mức độ ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của các endoxylanaza XynAÄNC và XynB. Hoạt tính tối đa được thiết lập ở 100%.

Fig.4 thể hiện hoạt tính tồn dư của các endoxylanaza sau khi ủ sơ bộ ở các nhiệt độ khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thấy rằng việc bổ sung xylanaza chịu nhiệt độ cao (và bền nhiệt độ cao) vào một thức ăn dẫn đến việc cải thiện về tỷ lệ chuyển hóa thức ăn bởi các động vật.

Mặc dù nhiệt độ làm việc tối ưu của các (endo)xylanaza chịu nhiệt độ cao là cao hơn nhiều so với nhiệt độ của đường ruột của động vật, song các tác giả sáng chế đã thấy rằng các enzym này đã cải thiện mức tăng trọng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn, ngay cả khi được so sánh với thức ăn thường được sử dụng là các (endo)xylanaza. Cụ thể hơn là các tác giả sáng chế đã thấy rằng các xylanaza có cả tính chịu nhiệt độ cao (lẫn bền nhiệt độ cao) cho các kết quả tốt hơn so với các xylanaza chịu nhiệt (và bền nhiệt).

Cả mức tăng thể trọng tuyệt đối của động vật (BWG) lẫn tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) đều được cải thiện, trong trường hợp các động vật được cho ăn thức ăn dạng bột hỗn hợp có bổ sung xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao, so với các động vật được cho ăn thức ăn dạng bột hỗn hợp không được bổ sung và với các động vật trong đó thức ăn dạng bột hỗn hợp đã được bổ sung xylanaza chủ yếu có hoạt tính ở khoảng 37-50°C.

Thuật ngữ "FCR" dùng để chỉ tỷ số giữa lượng thức ăn được tiêu thụ bởi động vật và mức tăng cân của nó. Tỷ số FCR thấp chứng tỏ sự sử dụng thức ăn hiệu quả hơn.

Những kết quả này trái ngược, trong trường hợp xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao được sử dụng, có hoạt tính xylanaza cực kỳ thấp được đo ở 37°C.

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế là đề xuất thức ăn (thức ăn cho động vật) có bổ sung (và/hoặc chứa) thành phần chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao (tức là, sự tối ưu nhiệt độ của (tổng) hoạt tính xylanolytic là lớn hơn 80°C, tốt hơn là lớn hơn 90°C hoặc 95°C và/hoặc tỷ số giữa hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu và hoạt tính ở 40°C là lớn hơn 10 hoặc thậm chí là lớn hơn 15 hoặc 20) và bền nhiệt độ cao (tức là, (tổng) hoạt tính xylanolytic của thành phần này là rất bền với sự bất hoạt nhiệt (sự biến tính), như trên 70% hoạt tính bền tới 30 phút gia nhiệt ở 90°C chất phụ gia chứa xylanaza này trong bể dầu).

Thức ăn này có thể chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao với lượng nằm trong khoảng từ 0,08mg/kg thức ăn đến 40mg/kg thức ăn, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg thức ăn đến 20mg/kg thức ăn, cũng tốt hơn nữa là từ 0,4mg/kg thức ăn đến 16mg/kg thức ăn của enzyme (tinh khiết) này.

Tốt hơn là, thức ăn này chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao với lượng nằm trong khoảng từ 10 DXU/kg thức ăn đến 5000 DXU/kg thức ăn, tốt hơn nữa là từ 25 DXU/kg thức ăn đến 2500 DXU/kg thức ăn, cũng tốt hơn nữa là từ 50 DXU/kg thức ăn đến 2000 DXU/kg thức ăn.

Trong Phần mô tả của sáng chế, một đơn vị của các xylanaza (DXU) được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1µmol đường khử (được biểu hiện là xyloza) trên phút từ dung dịch gồm 3% xylan birchwood ở độ pH 6 và ở 70°C, trừ khi có quy định khác được chỉ ra một cách cụ thể.

Một khía cạnh của sáng chế là đề cập đến chất phụ gia thức ăn (chất phụ gia thức ăn cho động vật) chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao.

Trong Phần mô tả của sáng chế, thuật ngữ “xylanaza bền nhiệt độ cao” dùng để chỉ xylanaza trong đó trên 70% (tổng) hoạt tính xylanolytic (có mặt trong thành phần này) là chịu tới (có khả năng chịu tới và/hoặc có thể duy trì được sau) 30 phút gia nhiệt (thành phần này) ở 90°C. Thuật ngữ “tổng hoạt tính xylanolytic” dùng để chỉ hoạt tính xylanolytic của xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ

cao, và cả hoạt tính của các xylanaza khác (tạp chất) không được ưu tiên có mặt trong thành phần này, được bổ sung vào thức ăn cho động vật, đã được mô tả theo sáng chế.

Tốt hơn là, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là lên tới 100% (tổng) hoạt tính xylanolytic có mặt trong thức ăn này và/hoặc trong chất phụ gia thức ăn này có thể được duy trì sau 30 phút (hoặc 45 phút hoặc 1 giờ) gia nhiệt (thức ăn này và/hoặc chất phụ gia thức ăn này) ở 90°C (hoặc ở 95°C).

Tốt hơn là, nhiệt độ tối ưu (sự tối ưu nhiệt độ) cho (tổng) hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần được bổ sung vào thức ăn theo sáng chế là lớn hơn 80°C, tốt hơn nữa là lớn hơn 85°C, 90°C hoặc thậm chí là lớn hơn 95°C.

Tốt hơn là, tỷ số hoạt tính của (tổng) hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần được bổ sung vào thức ăn theo sáng chế (chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) ở nhiệt độ tối ưu (ví dụ, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C hoặc thậm chí là khoảng 100°C) và ở 40°C (hoặc 37°C) là lớn hơn 10, tốt hơn nữa là lớn hơn 20.

Trong Phần mô tả của sáng chế, các thuật ngữ “enzym có hoạt tính xylanolytic”, “endoxylanaza” hoặc “xylanaza” dùng để chỉ enzym (ví dụ, xylanaza tái tổ hợp đã được tinh chế ít nhất một phần, hoặc không được ưu tiên là hỗn hợp của các enzym) có khả năng thủy phân các nội gắn kết glycosyl liên kết các gốc xyloza trong các polysacarit chứa xyloza. Các gắn kết glycosyl như vậy có thể là, ví dụ, gắn kết beta-1,4-glycosyl trong các đơn vị beta-D-xylopyranosyl-1,4-beta-D-xylopyranosyl của các polysacarit như vậy.

Các enzym được ưu tiên có hoạt tính xylanolytic gồm các endoxylanaza (EC 3.2.1.8.).

Các enzym được ưu tiên hoạt tính xylanolytic gồm các endoxylanaza thuộc họ glycosit hydrolaza 10.

Nằm trong số các enzym the được ưu tiên nhất có hoạt tính xylanolytic (xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) là các enzym có nguồn gốc từ chủng *Thermotoga maritima* và cũng tốt hơn nữa là XynB (SEQ.ID.NO:1) hoặc

các thể biến dị đóng của chúng (ví dụ, SEQ.ID.NO:2-5), hoặc bao gồm vùng bảo toàn nhất của các trình tự như nhau (các SEQ.ID.NO:1-5), tốt hơn là trong đó vùng được bảo toàn nhất này bao hàm motif xylanaza thuộc họ các glycosit hydrolaza 10 (phần được bảo toàn của motif xylanaza thuộc họ các glycosit hydrolaza 10 kéo dài trên các vùng 21-332 của trình tự SEQ.ID.NO:1-5, hoặc từ axit amin 21 tới axit amin cuối cùng 344, 346 hoặc 347 của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 này) hoặc chia sẻ tính tương đồng đáng kể (hoặc tương tự) với các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 này hoặc các vùng 21-332 (hoặc từ 21 tới axit amin cuối cùng 344, 346 hoặc 347) của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 này. (Các) enzym bổ sung có hoạt tính xylanolytic (xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) cũng có thể là protein dung hợp bao gồm các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 hoặc protein dung hợp bao gồm peptit chia sẻ tính tương đồng đáng kể (hoặc tương tự) với các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 này hoặc với các vùng 21-332 của các trình tự SEQ.ID.NO: 1-5 này.

Thuật ngữ "tính tương đồng đáng kể" trong Phần mô tả của sáng chế dùng để chỉ độ tương đồng ít nhất là 75%, tốt hơn là ít nhất là 80%, tốt hơn nữa là ít nhất là 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc thậm chí ít nhất là 99%. Tốt hơn là, độ tương đồng được đo trên độ dài đầy đủ của trình tự (hoặc đoạn) (được đề cập), như trên độ dài đầy đủ của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 hoặc trên độ dài đầy đủ của peptit gồm các axit amin 21-332 (hoặc các axit amin từ 21 tới axit amin cuối cùng) của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5. Thuật ngữ "tính tương tự đáng kể" trong Phần mô tả của sáng chế dùng để chỉ sự tương tự ít nhất là 85%, tốt hơn là ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là ít nhất là 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc thậm chí ít nhất là 99%. Tốt hơn là, độ tương tự được đo trên độ dài đầy đủ của trình tự (hoặc đoạn) (được đề cập), như trên độ dài đầy đủ của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5 hoặc trên độ dài đầy đủ của peptit gồm các axit amin 21-332 (hoặc các axit amin từ 21 tới axit amin cuối cùng) của các trình tự SEQ.ID.NO:1-5.

Sự liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai chuỗi nucleotit được mô tả bởi thông số "độ tương đồng" hoặc "độ tương tự". Cho các mục đích của

sáng chế, độ tương tự (và độ tương đồng) giữa hai trình tự axit amin được xác định như trong WO 2010/0142 697 nhờ sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS, tốt hơn là phiên bản 3.0.0 hoặc cao hơn. Các thông số tùy chọn được sử dụng là điểm phạt trong khoảng trống kéo dài là 10, điểm phạt trong khoảng trống kéo dài là 0,5, và chất nền thay thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Đầu ra của Needle được gán nhãn “độ tương đồng dài nhất” (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn không ngắn gọn (nobrief)) được sử dụng dưới dạng phần trăm tương tự và được tính toán như sau: $(\text{Các gốc tương đồng} \times 100) / (\text{Độ dài của trình tự xếp thẳng hàng} - \text{Tổng số khe hở trong trình tự xếp thẳng hàng})$. Đầu ra của Needle được gán nhãn “độ tương tự dài nhất” (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn không ngắn gọn (nobrief)) được sử dụng dưới dạng phần trăm tương tự và được tính toán như sau: $(\text{Các gốc tương tự} \times 100) / (\text{Độ dài của trình tự xếp thẳng hàng} - \text{Tổng số khe hở trong trình tự xếp thẳng hàng})$

Có lợi, nếu các xylanaza (và/hoặc thành phần chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) được bổ sung trong quá trình sản xuất thức ăn, là một chế phẩm rắn như chế phẩm dạng bột hỗn hợp hoặc viên tròn hoặc, là chất lỏng.

Quy trình tạo viên tròn thường bao gồm các bước ở nhiệt độ cao như phun hơi nước.

Ngược lại, thức ăn cho động vật có thể được sản xuất mà không cần sử dụng bước gia nhiệt (ví dụ, trên 50°C), ví dụ cho thức ăn không được tạo viên tròn.

Một khía cạnh của sáng chế là đề cập đến thức ăn (cho động vật) (và/hoặc hỗn hợp sơ chế (thức ăn)) tính theo một kg bao gồm từ 0,08mg tới 400mg (tốt hơn là từ 0,2mg/kg tới 40mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,4mg/kg tới 20mg/kg) là polypeptit có độ tương đồng trên 75% (tốt hơn là hơn trên 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%) (hoặc độ tương tự) với polypeptit được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, các axit amin 21-332 (hoặc từ axit amin 21 tới axit amin cuối cùng 344, 346 hoặc 347) của trình tự SEQ.ID.NO:1,

của trình tự SEQ.ID.NO:2, của trình tự SEQ.ID.NO:3, của trình tự SEQ.ID.NO:4 và của trình tự SEQ.ID.NO:5, polypeptit này tốt hơn là bền nhiệt độ cao và tốt hơn là có hoạt tính xylanaza chịu nhiệt độ cao.

Tốt hơn là, thức ăn (cho động vật) theo sáng chế bao gồm ít nhất là 50% (tính theo khối lượng khô) nguyên liệu thực vật, đặc biệt tốt nếu ít nhất là 55% hoặc thậm chí là ít nhất là 60%.

Tốt hơn là, nguyên liệu thực vật này được chọn từ nhóm gồm các loại ngũ cốc, các loại đậu, mật đường củ cải, bột khoai tây và bột đậu phộng và cũng có thể bao gồm hỗn hợp của chúng như các loại ngũ cốc và các loại đậu.

Tốt hơn là (hoặc ngoài ra), thức ăn theo sáng chế (bao gồm ít nhất là 50% nguyên liệu thực vật) bao gồm ít nhất là 5% (khối lượng khô) các protein, tốt hơn nữa là ít nhất 10%, ít nhất 15% hoặc thậm chí là ít nhất 20% các protein.

Tốt hơn là (hoặc ngoài ra), thức ăn theo sáng chế (bao gồm ít nhất là 50% nguyên liệu thực vật và/hoặc ít nhất là 5% các protein) bao gồm ít nhất là 2% (khối lượng khô) chất béo, tốt hơn nữa là ít nhất là 5% hoặc thậm chí là ít nhất là 8% chất béo.

Tốt hơn là, thức ăn theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm thức ăn ủ chua, thức ăn dạng hạt và thức ăn dạng bột hỗn hợp.

Một khía cạnh được đề cập khác của sáng chế là mô tả việc sử dụng (không nhằm trị liệu) thức ăn (và/hoặc việc sử dụng hỗn hợp sơ chế (thức ăn) và/hoặc việc sử dụng chất phụ gia thức ăn) có bổ sung xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao (và/hoặc việc sử dụng chất phụ gia thức ăn cho động vật theo sáng chế, và/hoặc việc sử dụng xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao theo sáng chế) để cải thiện mức tăng trọng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn của động vật (đang tăng trưởng) (và đặc biệt tốt là không tạo ra sự tăng cân bệnh lý quá mức).

Xylanaza được ưu tiên (chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) để cải thiện (không nhằm trị liệu) mức tăng cân (BWG) và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) của động vật (đang tăng trưởng) có trên 70%, 75%, 80%, 85% 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc thậm chí là trên 99% (tổng) hoạt tính xylanolytic là chịu tới 1 giờ gia nhiệt ở 90°C (hoặc 95°C).

Theo cách khác, hoặc ngoài ra, xylanaza được ưu tiên (chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao) được sử dụng để cải thiện (không nhằm trị liệu) mức tăng cân (BWG) và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) của động vật (đang tăng trưởng) là thuộc họ các glycosit hydrolaza 10.

Các xylanaza được ưu tiên nhất được sử dụng để cải thiện (không nhằm trị liệu) mức tăng cân (BWG) và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) của động vật (đang tăng trưởng) gồm các chủng *Thermotoga*, và cũng tốt hơn nữa là chia sẻ tính tương đồng đáng kể (tương tự) với các trình tự SEQ.ID.NO 1-5, hoặc với các đoạn 21-332 của các trình tự SEQ.ID.NO 1-5, hoặc bao gồm (dưới dạng protein dung hợp) peptit chia sẻ tính tương đồng đáng kể (tương tự) với các đoạn 21-332 của các trình tự SEQ.ID.NO 1-5.

Trong Phần mô tả của sáng chế, thuật ngữ “các động vật” được ưu tiên chỉ các động vật không phải con người và/hoặc các động vật không có (biểu hiện bên ngoài) bệnh học và/hoặc không có bệnh học liên quan tới sự thiếu cân.

Tốt hơn, nếu các động vật theo sáng chế không phải là các động vật nhai lại và/hoặc là các động vật có một dạ dày.

Tốt hơn nữa là, các động vật được chọn từ nhóm gồm lợn, gia cầm, cá và các động vật giáp xác, cũng tốt hơn nữa là lợn và/hoặc gia cầm.

Nguồn gốc và điều chế enzym

Một vài loài và chủng *Thermotoga* đã được đề xuất để tạo ra một hoặc nhiều endoxylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt. *Thermotoga maritima* tạo ra hai endoxylanaza bền nhiệt, được ký hiệu là XynA và XynB. XynA và XynB xuất hiện dưới dạng các protein có các khối lượng phân tử biểu kiến khoảng 120 và 40 kDa. Hoạt tính tối đa ở độ pH tối ưu (độ pH 6,2 và độ pH 5,4 lần lượt đối với XynA và XynB) được đo ở khoảng 92°C cho XynA và ở khoảng 105°C cho Xyn B (Winterhalter and Liebl, 1995, Appl. Env. Microbiol., 61, 1810-1815).

WO93/19171 mô tả quy trình để tạo ra các xylanaza từ *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana* và *T. thermarum*.

Các trình tự ADN và các protein của các endo-xylanaza từ một vài chủng và loài xylanaza *Thermotoga* đã được công bố. Các xylanaza này có thể được phân nhóm thành hai loại theo tính tương đồng trình tự với XynA và XynB của *T. maritima*.

Không có tài liệu trích dẫn nào, ít nhất là chưa từng có tài liệu trích dẫn nào đề cập đến sự tối ưu nhiệt độ rất cao và hầu như không có hoạt tính ở 40°C, mô tả việc sử dụng xylanaza của *Thermotoga* đã phân lập, như XynB, làm chất phụ gia thức ăn.

Các xylanaza có thể được tạo ra từ các nguồn cấp khác nhau. Các xylanaza có thể được phân lập/được tinh chế sau khi có sự tăng trưởng của chủng *Thermotoga* được chọn trong môi trường nuôi cấy thích hợp.

Các xylanaza có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy chủng tái tổ hợp biểu hiện gene mã hóa cho một protein tương ứng (ví dụ, XynB).

Các gen thích hợp có thể được chọn trong số các gen mã hóa cho endo-1,4-beta-xylanaza thuộc loài *Thermotoga* sp. RQ2 (GenBank: ACB09229.1), endo-1,4-beta-xylanaza thuộc loài *Thermotoga naphthophila* RKU-10 (GenBank: ADA66795.1), the xylanaza from *Thermotoga neapolitana* (GenBank: CAA90235.1), endo-1,4-beta-xylanaza thuộc loài *Thermotoga* sp. FjSS3-B.1 (GenBank: AAA90913.1) hoặc endo-1,4-beta-xylanaza B from *Thermotoga maritima* MSB8 (GenBank: AAD35164.1 - Fig.1 - SEQ ID NO 1).

Hơn thế nữa, các thể biến dị của các enzym này biểu hiện một nhiệt độ tối ưu của hoạt tính (hoạt tính nhiệt) và tính bền nhiệt nằm trong các khoảng được mô tả ở trên có thể được tạo ra bởi việc cải biến trình tự mã hóa của các gen này.

Các cải biến trình tự có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở (các) thay thế axit amin, (các) khuyết đoạn và/hoặc (các) cài xen. Các cải biến trình tự được ưu tiên gồm các thay thế bảo toàn (ví dụ, được gán nhãn dương tính sau phép phân tích BLASTp).

Tốt hơn là, các enzym thể biến dị có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 80% với MSB8 XynB của *Thermotoga maritima*, tốt hơn nữa là có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 95% hoặc có độ tương tự trình tự axit amin ít nhất là 90% với MSB8 XynB của *Thermotoga maritima*, tốt hơn nữa là ít nhất là 93%, 94%, 95%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 98%.

Xylanaza tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong cơ thể vật chủ thích hợp bất kỳ. Các vật chủ thích hợp cụ thể gồm vi khuẩn, men và nấm. Các vật chủ vi khuẩn được ưu tiên gồm các chủng *Escherichia coli* và *Bacillus* (*subtilis*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens*, *megaterium*...) hoặc *Streptomyces* (*coelicolor*, *lividans*, ...)

Các vật chủ men được ưu tiên gồm các chủng *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* hoặc *Yarrowia lipolytica*. Các vật chủ nấm được ưu tiên gồm các chủng *Aspergillus* (*nidulans*, *niger*, ...), *Penicillium* và *Trichoderma*.

Các xylanaza có thể còn được tạo ra dưới dạng thực vật và/hoặc hạt biến đổi gen biểu hiện enzym tương ứng hoặc từ động vật biến đổi gen.

Xylanaza có thể được điều chế bằng cách nuôi cấy *Thermotoga* hoặc chủng vi sinh tái tổ hợp trong môi trường thích hợp cho sự phát triển và sự biểu hiện của xylanaza. Tốt hơn là, chủng này được nuôi cấy trong các bình bên men.

Sau khi nuôi cấy, xylanaza có thể là được thu hồi dưới dạng dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy hoặc phân chiết tế bào. Dịch nổi trên bề mặt hoặc phân chiết tế bào tốt hơn là được tinh chế tiếp để tạo ra chế phẩm đã được bán tinh chế hoặc đã được tinh chế. Các phương pháp tinh chế thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở các phương pháp ly tâm, vi lọc, siêu lọc, kết tủa, sắc ký ...

Các xylanaza có thể được tạo ra dưới dạng chế phẩm lỏng hoặc khô (dạng bột). Tốt hơn, nếu các chế phẩm lỏng được làm ổn định bằng cách thêm một thành phần thích hợp như muối (NaCl) hoặc glyxerol. Các chế phẩm bột có thể được tạo ra, ví dụ, sấy phun hoặc sấy đông lạnh. Các xylanaza có thể được bao.

Xác định hoạt tính enzym

Đã biết một vài phương pháp để xác định hoạt tính enzym của các endoxylanaza trong các chế phẩm lỏng. Thích hợp cụ thể là phương pháp sử dụng đặc tính của các endoxylanaza để thủy phân xylan làm nền. Phản ứng thủy phân này giải phóng các đường khử gây ra sự phát triển màu thông thường bởi phản ứng với axit đinitrosalixylic (DNS). Cường độ màu ở 570nm tỷ lệ thuận với hoạt tính xylanaza trong mẫu, miễn là nồng độ chất nền thỏa đáng (tức là, không lớn hơn 10% thoái biến và/hoặc nồng độ bão hòa của chất nền được duy trì trong suốt thử nghiệm).

Một DXU xylanaza được xác định là lượng enzym giải phóng 1 μ mol đường khử (dưới dạng đương lượng xyloza) trên phút từ dung dịch 3% (trọng lượng:thể tích) xylan birchwood và trong 100mM chất đệm xitrat-phosphat ở độ pH 6 ở 70°C. Phản ứng được thực hiện trong 15 phút với thể tích 0,8mL (0,7mL chất nền + 0,1mL xylanaza đã pha loãng). Sau khi ủ, phản ứng được kết thúc bởi việc bổ sung 1mL chất phản ứng DNS (thành phần: NaOH 400mM, axit 3,5-đinitrosalixylic 40mM, kali natri tartrat 1M). Sau đó, hỗn hợp này được giữ ở 95°C trong 15 phút, và sau đó được làm nguội ở 25°C trong 5 phút. Sau cùng, độ hấp thụ ở 570nm được đo so với đối chứng.

Để đánh giá hoạt tính xylanaza (DXU/ml) xét về sự tạo đường khử, đường cong chuẩn xyloza được tạo ra bằng xyloza thay cho chế phẩm pha loãng enzym. Tất cả các quá trình ủ chất nền và các phép đo sau đó được thực hiện ba lần lặp lại.

Xác định độ ổn định nhiệt và nhiệt độ hoạt tính tối ưu của endoxylanaza

Sự phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính xylanaza được phân tích bằng một biến thể của phương pháp đường khử axit axit đinitrosalixylic (DNS) đã mô tả ở trên. Phương pháp DNS được thực hiện hỗn hợp enzym/chất nền được ủ trong bể dầu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 100°C. Các thông số khác của phương pháp này được giữ nguyên không đổi.

Độ ổn định nhiệt được kiểm tra bằng cách ủ trước các chế phẩm enzym trong bể ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 100°C. Các mẫu được lấy sau 0,

10, 30, 60 (và 90) phút và được làm lạnh trong bể đá trong 10 phút. Hoạt tính tồn dư được thử nghiệm ba lần lặp lại bằng phương pháp được mô tả ở trên.

Thành phần thức ăn

Các thức ăn cho động vật (bao gồm các thức ăn ủ chua) có thể chứa các loại ngũ cốc như lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, ngô, gạo, lúa miến, lúa mì spenta, lúa mì lúa mạch đen hoặc yến mạch hoặc các sản phẩm phụ của ngũ cốc như cám lúa mì, rom lúa mạch, lõi ngô, yến mạch xay, lúa mì nghiền, gluten lúa mì, mầm lúa hoặc cám ngô, hoặc các nguyên liệu thực vật khác như đậu tương hoặc các loại đậu khác, hạt cải dầu, đậu lupin, đậu Hà lan, bột sắn, mật đường củ cải, bột khoai tây, bột đậu phộng. Các loại ngũ cốc được ưu tiên gồm lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen.

Tốt hơn là, thành phần thức ăn cho động vật theo sáng chế chứa ít nhất là một protein thực vật hoặc nguồn cấp protein. Các ví dụ về protein thực vật hoặc các nguồn cấp protein gồm đậu tương, và các loại ngũ cốc như lúa mạch, ngô, yến mạch, gạo, lúa mạch đen, lúa miến và lúa mì.

Có lợi, nếu thành phần thức ăn cho động vật theo sáng chế bao gồm 0-80% ngô; và/hoặc 0-80% lúa miến; và/hoặc 0-70% lúa mì; và/hoặc 0-70% lúa mạch; và/hoặc 0-30% yến mạch; và/hoặc 0-40% bột đậu tương; và/hoặc 0-10% bột cá; và/hoặc 0-20% whey.

Có lợi, nếu thành phần thức ăn cho động vật theo sáng chế chứa các thành phần thức ăn bổ sung hoặc các chất phụ gia như các enzym, các prebiotic, các probiotic, các khoáng chất và các nguyên tố vi lượng, các vitamin và các tiền vitamin, thực vật, các protein vi sinh hoặc động vật, các axit amin, các muối và các chất tương tự của chúng, tinh bột, các xơ, các hydrat cacbon và đường hoặc chất làm ngọt, các dầu và các bột khô dầu, các mỡ thực vật hoặc động vật, các thuốc nhuộm và các chất màu khác, các tác nhân nhũ hoá và làm ổn định, các chất làm đặc và các tác nhân gel hóa, các chất kết dính, các chất chống dính và các chất làm đông tụ, các chất bảo quản, các tác nhân điều chỉnh tính axit, các carotenoit và

xanthophyll, ure và các dẫn xuất của nó, các chất tăng cường khả năng tiêu hóa, các chất làm ổn định gut flora, các chất kháng cầu trùng và các chất y học khác.

Các enzym bổ sung được ưu tiên được chọn từ nhóm gồm các phytaza, các amylaza, các xenlulaza, glucanaza, các proteaza, các mannanaza, các pectinaza, các hemixenlulaza và các xylanaza khác (ít được ưu tiên).

Các khoáng chất được ưu tiên được chọn từ nhóm gồm các muối (các clorua, các sulfat, các florua, các cacbonat, các oxit, ...), canxi, phospho, magie, kali, natri, mangan, kẽm, niken, molybden, đồng, sắt, selen, coban và iot.

Các vitamin được ưu tiên được chọn từ nhóm gồm vitamin A, caroten, axit ascorbic, vitamin D, D3, E, K, B1 thiamin, pyridoxin B6, biotin, cholin, axit folic, niacin, axit panthotenic, B2 riboflavin, xyanocobalamin, ...

Các protein thích hợp được chọn từ nhóm gồm các protein thực vật, vi sinh vật hoặc động vật.

Các axit amin thích hợp được chọn từ nhóm gồm metionin, xystein, lysin, threonin, tryptophan, isoleuxin, leuxin, valin, histidin, arginin, glyxin, serin, phenylalanin, tyrosin, axit aspartic, axit glutamic, prolin.

Các vi sinh vật thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*.

Các chất phụ gia khác có thể được sử dụng, và đã được chỉ ra, ví dụ, trong ấn phẩm: Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) N°1831/2003 - Appendixes 3a&4 - Annex: List of additives, and its updates.

Sản xuất thức ăn

Các khẩu phần thức ăn cho động vật có thể được sản xuất dưới dạng thức ăn dạng bột hỗn hợp (không được tạo viên tròn) hoặc thức ăn dạng đã được tạo viên tròn. Thông thường, nguyên liệu thức ăn đã xay được trộn và hàm lượng thỏa đáng của các vitamin chủ yếu và các khoáng chất được bổ sung tùy theo các loài động vật được đề cập đến.

Thành phần theo sáng chế có thể được bổ sung dưới dạng chế phẩm enzym rắn hoặc lỏng, hoặc dưới dạng chất phụ gia thức ăn, như hỗn hợp sơ chế.

Thành phần rắn thường được bổ sung trước hoặc trong bước trộn; và thành phần lỏng thường được bổ sung sau bước tạo viên tròn.

Tuy nhiên, thành phần enzym có tính bền nhiệt và có tính chịu nhiệt cũng có thể được bổ sung trước bước tạo viên tròn.

Liều lượng xylanaza theo sáng chế trong thức ăn có thể được tối ưu bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm và hiệu chỉnh như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các xylanaza khác nhau có thể có các khoảng liều lượng tối ưu khác nhau.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế các endoxylanaza của *Thermotoga*

Tách dòng các vùng xúc tác của các xylanaza XynA và XynB từ Thermotoga maritima

Trên cơ sở các trình tự đã công bố của các gen xynA của *Thermotoga* (GenBank/số truy cập GenPept™ Z46264) và xynB (GenBank/ số truy cập GenPept™ AAD35164) toàn bộ gen xynB và đoạn ADN tương ứng với vùng xúc tác của gen xynA (xynAÄNC) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR từ hệ gen ADN của *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM3109/ATCC43589) theo các quy trình thông thường.

Các sản phẩm PCR được tách dòng vào vật truyền pGEM-T Vector SystemI (Promega), bằng cách sử dụng phương pháp được khuyến dùng bởi nhà cung cấp, và được sử dụng để biến đổi các tế bào siêu khả biến *E. coli* DH5α®. Việc lựa chọn Xanh da trời-trắng cho phép lựa chọn các khuẩn lạc trắng mang đoạn PCR. Các chế phẩm plasmit đã tinh chế (Nucleospin plasmide, Macherey-Nagel) được giải trình tự trên máy giải trình tự ALF DNA sequencer (Pharmacia Biotech). Việc giải trình tự của đoạn được lồng vào được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi chung T7 và RP cũng như các đoạn mồi tương ứng với các trình tự ADN bên trong. Các trình tự đã thu được là tương đồng với các trình tự đã

công bố (GenBank/số truy cập genPept™ Z46264 cho xynA và số truy cập AAD35164 cho xynB).

Đoạn ADN tương ứng với dẫn xuất vùng xúc tác của the XynA modul (XynAΔNC) và gen xynB đầy đủ được tách dòng phụ vào vật truyền tách dòng pET 22b(+)(Novagen). Các plasmit tái tổ hợp thu được được biến đổi trong các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene).

Nuôi cấy các chủng tái tổ hợp và sản xuất các xylanaza XynAΔNC và XynB từ Thermotoga maritima

15mL giống nuôi cấy sơ bộ trong 5 giờ (37°C) của các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang các gen xylanaza được ly tâm với mức 10000g trong 1 phút và viên tròn được treo lủng lại trong 900mL nước thịt Terrific (12g/l Bacto tryptone (Difco), 24g/l phần chiết men (Difco), 4ml/l glyxerol, 12,54g/l K₂HPO₄, 2,31g/l KH₂PO₄) chứa 200μg/ml ampicilin trong bình cầu có lắc loại 3 lít. Các giống nuôi cấy được ủ ở 37°C và 250 vòng/phút cho đến khi độ hấp thụ ở 550nm nằm trong khoảng giữa 3 & 4 đã đạt được, khi đó sự biểu hiện của enzym được gây ra bằng 1mM isopropyl-1-thio-β-galactopyranosit.

Sau khi ủ trong 15 giờ ở 37°C, các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 18000g trong 30 phút ở 4°C, treo lủng lại trong 50mM BICINE chứa 10mM NaCl, được ngắt trong bộ ngắt tế bào đã làm lạnh trước (Constant System Ltd., Warwick, UK) ở 28Kpsi và được ly tâm ở 40000 g trong 30 phút. ADN nhiễm sắc thể được loại bỏ ra khỏi các sản phẩm phân giải tế bào thô bằng cách xử lý bằng 0,2% protamin sulfat (Calbiochem) và ly tâm ở 40000g trong 30 phút. Sau đó, 25 đơn vị benzonaza (Merck, Darmstadt, Germany) được bổ sung vào dung dịch này.

Thu hồi các xylanaza tái tổ hợp XynAΔNC và XynB

Các chế phẩm enzym của XynAΔNC và của XynB từ *Thermotoga maritima* được biểu hiện trong *Escherichia coli* được cô bằng cách siêu lọc bởi việc tái tuần hoàn các chế phẩm lỏng này trên màng UF polyethersulphone Biomax (ngưỡng = 5 kDa) trên hệ thống Proflux (Milipore). Các dung dịch enzym

đã cô này được lọc trên hệ thống lọc vô trùng, bao gồm vài bước có ngưỡng khác nhau và cuối cùng là bộ lọc tuyệt đối (ngưỡng = $0,22\mu\text{M}$) (Milipore).

Các enzym lỏng đã cô này được làm khô bằng cách sử dụng hệ thống làm khô kiểu tầng sôi ProCell LabSystem (Glatt) trong đó nó được phun trên chất mang (lúa mì bột mì), tạo ra chế phẩm enzym dạng hạt ít bụi.

Tinh chế các xylanaza tái tổ hợp XynA Δ NC và XynB

XynA Δ NC được tinh chế bằng cách áp dụng phương pháp ba bước. Phần chiết thô được thẩm tách 2500x đối với chất đệm sắc ký (Tris-HCl 20mM, độ pH 8,0) và được nạp vào Q HP XK 16/20 (GE Healthcare), cột trao đổi anion mạnh và được rửa giải bằng gradien tuyến tính (0 - 1M NaCl). sau đó, chế phẩm đã được bán tinh chế này được thẩm tách 2500x đối với chất đệm sắc ký (Tris-HCl 20mM, độ pH 8,0) và được nạp vào Sephacryl S-100 HR 120mL XK 16/70 (GE Healthcare), là cột sắc ký loại trừ kích cỡ. Các phân đoạn hoạt tính được gộp lại, được thẩm tách 2500x đối với chất đệm sắc ký (Tris-HCl 20mM, độ pH 8,0) và được nạp vào Mono-Q GL 5/50 (GE Healthcare), là cột trao đổi anion mạnh và được rửa giải bằng gradien tuyến tính (0-1M NaCl). Các phân đoạn đã tinh chế được gộp lại và độ tinh khiết của chúng được kiểm tra trên SDS-PAGE (Fig.2a).

XynB được tinh chế bằng cách áp dụng phương pháp hai bước. Phần lớn các protein vật chủ được loại bỏ bởi việc xử lý nhiệt chế phẩm enzym (30 phút ở 75°C), tiếp đó ly tâm (12000 x g ở 4°C). Dịch nổi trên bề mặt được thẩm tách 2500x đối với chất đệm sắc ký (Bis-Tris 20mM, độ pH 6,2, được nạp vào cột trao đổi ion Q-Sepharosa FF (GE Healthcare) và được rửa giải bằng gradien tuyến tính (0-1M NaCl). Độ thiếc khiết của xylanaza tái tổ hợp đã được kiểm tra trên SDS-PAGE (Fig.2b).

Đặc tả các enzym tái tổ hợp

Hoạt tính xylanaza của xynA Δ NC và xynB được xác định ở các nhiệt độ khác nhau bằng cách áp dụng các điều kiện thử nghiệm như đã được mô tả. Các hoạt tính tối đa lần lượt là 70°C và $90-95^{\circ}\text{C}$ (Fig.3).

Độ bền của các enzym tái tổ hợp được đánh giá bằng cách áp dụng quy trình như được mô tả ở trên. Các kết quả (Fig.4) đã cho thấy rằng XynAÄNC duy trì 30% hoạt tính của nó sau khi ủ ở 60°C trong 60 phút XynB giữ nguyên 100% hoạt tính của nó sau khi ủ ở 90°C trong 60 phút

Ví dụ 2: Sử dụng các xylanaza của *Thermotoga maritima* (XynAÄNC và XynB) trong thức ăn cho động vật

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng gà giò (Belgabroed) trống hoặc mái. Từ 1 ngày tới 42 ngày tuổi, chúng được giữ trong chuồng nuôi và cho ăn thức ăn nuôi gà thịt thương mại có bổ sung hoặc không bổ sung các xylanaza ngoại sinh. Ở 1 ngày tuổi, các động vật này (768 con gà - 384 con trống/384 con mái) được phân một cách ngẫu nhiên trong 24 chuồng (4 xử lý x 2 giới tính x 3 lần lặp lại) với 32 con/chuồng, 0,8m³/chuồng. Ở 14 ngày tuổi, các động vật này được phân bố trong 48 chuồng (4 xử lý x 2 giới tính x 6 lần lặp lại) với 16 con. Mỗi chuồng được trang bị 2 vò uống nước và một khay ăn. Nhiệt độ là 35°C khi bắt đầu, và sau đó được giảm 0,5°C mỗi ngày; ở ngày 22, nhiệt độ được duy trì ở 22°C. Chu kỳ chiếu sáng là 23 giờ 30 phút chiếu sáng và 30 phút tối cho giai đoạn thứ nhất và 18 giờ chiếu sáng và 6 giờ tối cho giai đoạn thứ hai. Các con gà được chủng ngừa phòng chống bệnh toi gà Newcastle ở ngày 1 (tại trại giống) và phòng chống bệnh Gumboro + Newcastle ở ngày 14 (thông qua nước uống).

Bốn xử lý được bao gồm trong thử nghiệm này. Khẩu phần thức ăn trên cơ sở lúa mì (Bảng 1), hoặc là không được bổ sung enzym (đối chứng), hoặc là được bổ sung với lượng tương đương 500 DXU *Thermotoga maritima* XynAÄNC/kg thức ăn hoặc với lượng tương đương 400 DXU *Thermotoga maritima* XynB/kg thức ăn hoặc xylanaza của *Bacillus subtilis* (BelfeedTM B1100MP (E1606), endo-1,4-beta-xylanaza có bán sẵn của Beldem - là một chi nhánh của Puratos, Groot-Bijgaarden, Belgium) với liều lượng được khuyến cáo là 10 UI/kg thức ăn (đối chứng dương).

Các tác giả sáng chế đã so sánh các mức độ khác nhau của đối chứng dương (cám Belfeed xylanaza thương phẩm), như 50 UI/kg thức ăn và đã thấy

rằng cả hai thông số (BWG và FCR) đều đạt mức cân bằng ở 10 UI/kg thức ăn. Do đó, các tác giả sáng chế đã sử dụng lượng này cho đối chứng dương.

Các enzym được bổ sung vào thức ăn dưới dạng lỏng (XynAÄNC và XynB) hoặc bột (Belfeed) được đưa vào hỗn hợp sơ chế trước khi trộn nó vào khẩu phần ăn. Các khẩu phần ăn được cho các động vật ăn tùy thích dưới dạng bột hỗn hợp. Nước cũng được cho uống tự do.

Thể trọng được ghi lại ở ngày 1, ngày 14 và ngày 42. Việc cung cấp thức ăn được ghi lại và thức ăn còn lại trong khay được đo ngay sau lần cân 2 và 3.

Mức tăng cân (BWG) và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) được xác định trong các giai đoạn 1-14 ngày, 14-42 ngày và 1-42 ngày tuổi.

Bảng 1

Thành phần thức ăn và hàm lượng của các chất dinh dưỡng chính.

Các nguyên liệu	Hàm lượng
Lúa mì	57,20%
Bột đậu tương	18,73%
Đậu tương đã xử lý nhiệt	13,00%
Mỡ động vật	4,00%
Lúa mì gluten	2,00%
Dầu đậu tương	0,467%
NaCl	0,250%
Biolys	0,283%
DL-Metionin	0,233%
Threonin	0,083%
CaCO ₃	0,533%
Monocanxi Phosphat	0,933%
Natri bicarbonat	0,100%
Hỗn hợp sơ chế vitamin/khoáng chất	1,500%
Hỗn hợp sơ chế Natuphos	0,500%

Betacid GM	0,188%
Protein thô	20,50%
Chất béo thô	8,50%
Các tro thô	6,00%
Xơ thô	3,00%
Metionin	0,53%
Tổng photpho	0,61%
Vitamin A	15100 UI/kg
Vitamin D3	3000 UI/kg
Vitamin E	30mg/kg
Phytaza (EC 3.1.3.8) E1600	500 FTU/kg

Các kết quả của thử nghiệm này được trình bày trong Bảng 2 thể hiện BWG và FCR trung bình của các gà giò trong hai giai đoạn.

Bảng 2

	BWG (g/con gà)			FCR (g/g)			FCR tiêu chuẩn
	1-14 ngày	14-42 ngày	1-42 ngày	1-14 ngày	14-42 ngày	1-42 ngày	
Đối chứng	315,0	1638,0	1961,4	1,394	1,819	1,691	1,737
Belfeed	330,4	1811,6	2146,2	1,368	1,728	1,626	1,587
XynAÄN C	327,6	1789,2	2129,4	1,368	1,775	1,659	1,667
XynB	319,2	1884,4	2205,0	1,361	1,720	1,624	1,562

Cả sự tăng trưởng lẫn FCR đều đã cải thiện đối với các khẩu phần ăn chứa XynAÄNC và XynB, cả sau 14 ngày của giai đoạn đầu lẫn sau tổng cộng 42 ngày của giai đoạn vỗ béo. XynB thể hiện tính năng tốt hơn so với XynAÄNC.

Ví dụ 3: Sử dụng các xylanaza của *Thermotoga maritima* (XynB) trong thức ăn cho động vật

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng gà giò (Belgabroed) trống hoặc mái. Từ 1 ngày tới 42 ngày tuổi, chúng được giữ trong chuồng nuôi và cho ăn thức ăn nuôi gà thịt thương mại có bổ sung hoặc không bổ sung các xylanaza ngoại sinh. Ở 1 ngày tuổi, các động vật này (768 con gà - 384 con trống/384 con mái) được phân một cách ngẫu nhiên trong 24 chuồng (4 xử lý x 2 giới tính x 3 lần lặp lại) với 32 con/chuồng, 0,8m³/chuồng. Ở 14 ngày tuổi, các động vật này được phân bố trong 48 chuồng (4 xử lý x 2 giới tính x 6 lần lặp lại) với 16 con. Mỗi chuồng được trang bị 2 vò uống nước và một khay ăn. Nhiệt độ là 35°C khi bắt đầu, và sau đó được giảm 0,5°C mỗi ngày; ở ngày 22, nhiệt độ được duy trì ở 22°C. Chu kỳ chiếu sáng là 23 giờ 30 phút chiếu sáng và 30 phút tối cho giai đoạn thứ nhất và 18 giờ chiếu sáng và 6 giờ tối cho giai đoạn thứ hai. Các con gà được chủng ngừa phòng chống bệnh toi gà Newcastle ở ngày 1 (tại trại giống) và phòng chống bệnh Gumboro + Newcastle ở ngày 14 (thông qua nước uống).

Bốn xử lý được bao gồm trong thử nghiệm này. Khẩu phần thức ăn trên cơ sở lúa mì (Bảng 3), được bổ sung hoặc là với lượng tương đương 200 DXU XynB/kg thức ăn hoặc với lượng tương đương 400 DXU XynB/kg thức ăn hoặc thương phẩm xylanaza nấm Hostazym® X (Huvepharma; EC N°E1617) với liều lượng được khuyến cáo 100ppm hoặc *Bacillus subtilis* xylanaza (Belfeed™ B1100MP (E1606), endo-1,4-beta-xylanaza có bán sẵn của Beldem - là một chi nhánh của Puratos, Groot-Bijgaarden, Belgium) với liều lượng được khuyến cáo 10 UI/kg thức ăn hoặc 100ppm.

Các enzym được bổ sung vào thức ăn ở dạng bột được đưa vào hỗn hợp sơ chế trước khi trộn nó vào khẩu phần thức ăn. Các khẩu phần ăn được cho các động vật ăn tùy thích dưới dạng bột hỗn hợp. Nước cũng được cho uống tự do.

Các thể trọng được ghi lại ở ngày 1, ngày 14 và ngày 42. Việc cung cấp thức ăn được ghi lại và thức ăn còn lại trong khay được đo ngay sau lần cân 2 và 3

Mức tăng cân (BWG) và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR) được xác định trong các giai đoạn 1-14 ngày, 14-42 ngày và 1-42 ngày tuổi.

Bảng 3

Thành phần thức ăn và hàm lượng của các chất dinh dưỡng chính.

Các nguyên liệu	Hàm lượng
Lúa mì	58,19%
Bột đậu tương	20,16%
Đậu tương đã xử lý nhiệt	10,00%
Mỡ động vật	4,00%
Bã cải	2,00%
Dầu đậu tương	1,133%
NaCl	0,233%
Biolys	0,283%
DL-Metionin	0,233%
Threonin	0,083%
CaCO ₃	0,500%
Monocanxi Phosphat	0,968%
Natri bicarbonat	0,134%
Hỗn hợp sơ chế vitamin/khoáng chất	1,500%
Hỗn hợp sơ chế Natuphos	0,500%
Cholin clorua	0,083%

Các kết quả của thử nghiệm này được trình bày trong Bảng 4 thể hiện BWG và FCR trung bình của các gà giò trong hai giai đoạn.

Bảng 4

	BWG (g/con gà)			FCR (g/g)			FCR tiêu chuẩn
	1-14 ngày	14-42 ngày	1-42 ngày	1-14 ngày	14-42 ngày	1-42 ngày	
Hostazyme	308,0	2004,8	2318,4	1,492	1,787	1,714	1,604
Belfeed	315,0	2035,6	2339,4	1,462	1,727	1,660	1,537
XynB 200u	347,2	2088,8	2452,8	1,344	1,720	1,615	1,460
XynB 400u	334,6	2108,4	2469,6	1,342	1,708	1,611	1,454

Cả sự tăng trưởng lẫn FCR đều đã cải thiện đối với các khẩu phần ăn chứa các enzym XynB, cả sau 14 ngày của giai đoạn đầu lẫn sau tổng cộng 42 ngày của giai đoạn vỗ béo. XynB thể hiện BWG và FCR tốt hơn so với các thương phẩm xylanaza khác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thức ăn cho động vật được chọn từ nhóm gồm thức ăn ủ chua, thức ăn dạng hạt và thức ăn dạng bột hỗn hợp, thức ăn cho động vật này được bổ sung thành phần chứa xylanaza, trong đó xylanaza này là chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao, trong đó sự tối ưu nhiệt độ của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là lớn hơn 80°C, trong đó trên 70% hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là chịu tới 30 phút gia nhiệt ở 90°C và trong đó tỷ số hoạt tính của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này ở nhiệt độ tối ưu và ở 40°C là lớn hơn 10.
2. Thức ăn cho động vật theo điểm 1, trong đó nhiệt độ tối ưu của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là lớn hơn 85°C, tốt hơn là lớn hơn 90°C.
3. Thức ăn cho động vật theo điểm 1 hoặc 2, trong đó tỷ số hoạt tính của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này ở nhiệt độ tối ưu và ở 40°C là lớn hơn 20.
4. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hoạt tính xylanaza có mặt trong thành phần được đo bằng cách sử dụng 3% (trọng lượng:thể tích) xylan, tốt hơn là sử dụng 3% (trọng lượng:thể tích) xylan birchwood, làm nền.
5. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hoạt tính xylanaza có mặt trong thành phần được đo sau 15 phút phản ứng.
6. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao có độ tương đồng trên 80% và/hoặc độ tương tự trên 95% với xylanaza được chọn từ nhóm gồm các trình

tự SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, các axit amin 21-332 của trình tự SEQ.ID.NO:1, của trình tự SEQ.ID.NO:2, của trình tự SEQ.ID.NO:3, của trình tự SEQ.ID.NO:4 và của trình tự SEQ.ID.NO:5.

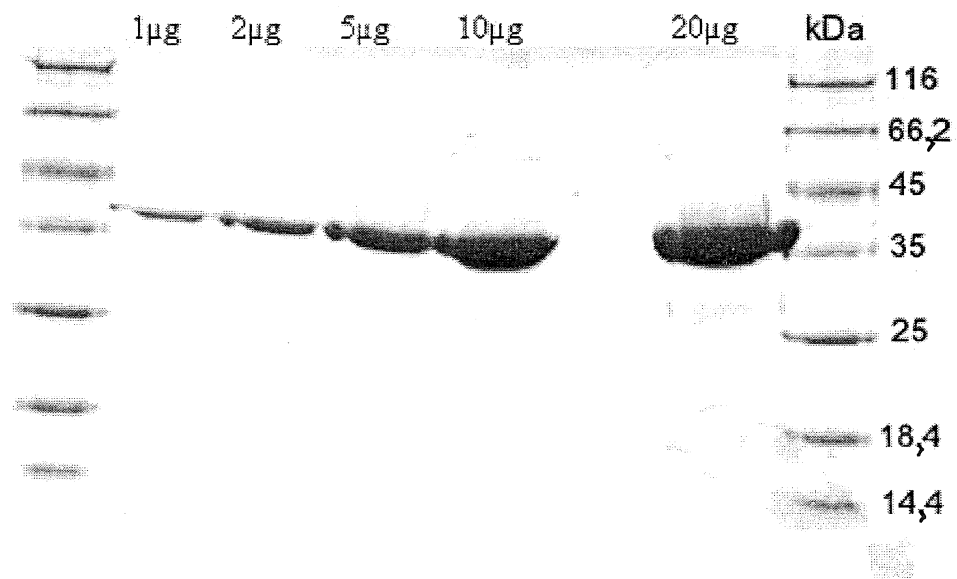
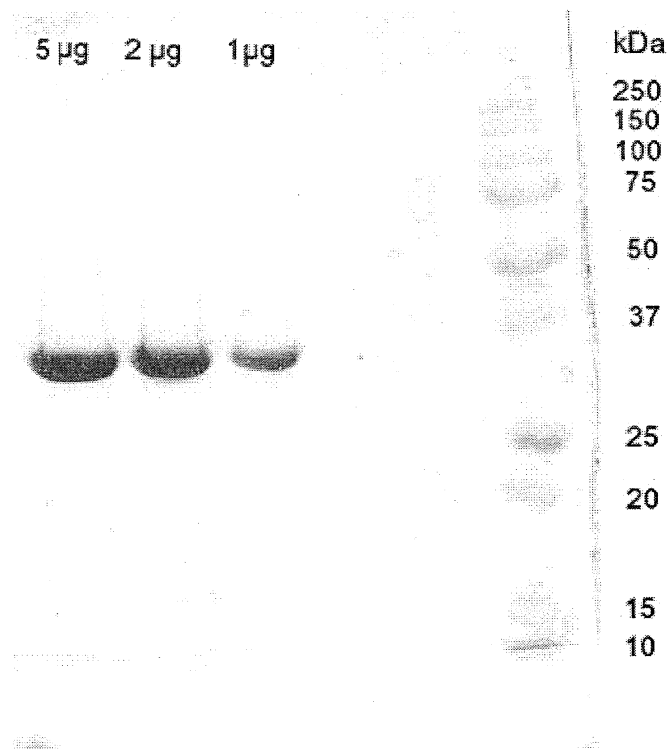
7. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao có độ tương đồng trên 99% với xylanaza được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ.ID.NO:1, SEQ.ID.NO:2, SEQ.ID.NO:3, SEQ.ID.NO:4, SEQ.ID.NO:5, các axit amin 21-332 của trình tự SEQ.ID.NO:1, của trình tự SEQ.ID.NO:2, của trình tự SEQ.ID.NO:3, của trình tự SEQ.ID.NO:4 và của trình tự SEQ.ID.NO:5.
8. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nó bao gồm từ 0,08 tới 40mg/kg xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao.
9. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nó bao gồm ít nhất là 50% (tính theo khối lượng khô) nguyên liệu thực vật.
10. Thức ăn cho động vật theo điểm 9, trong đó nguyên liệu thực vật được chọn từ nhóm gồm các loại ngũ cốc, các loại đậu, mật đường củ cải, bột khoai tây và bột đậu phộng.
11. Thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nó bao gồm ít nhất là 5% (khối lượng khô) các protein và/hoặc ít nhất là 2% (khối lượng khô) chất béo.
12. Phương pháp sản xuất thức ăn cho động vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 11 bao gồm các bước:
 - a) lựa chọn thức ăn chứa hemixenluloza;

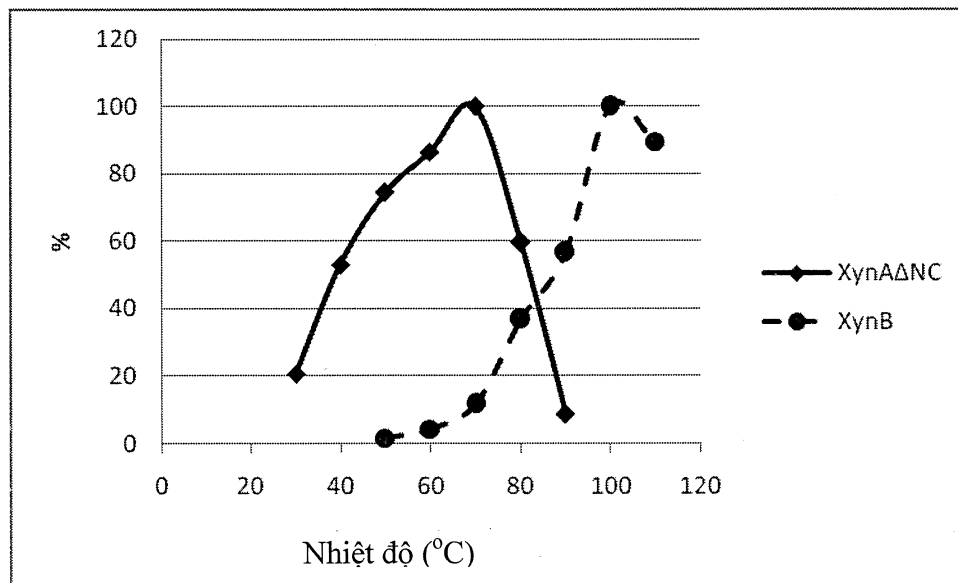
b) bổ sung thành phần chứa xylanaza chịu nhiệt độ cao và bền nhiệt độ cao, trong đó trên 70% hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là chịu tới 30 phút gia nhiệt thành phần này ở 90°C, trong đó sự tối ưu nhiệt độ của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này là lớn hơn 80°C, và trong đó tỷ số hoạt tính của hoạt tính xylanolytic có mặt trong thành phần này ở nhiệt độ tối ưu và ở 40°C là lớn hơn 10.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó hoạt tính xylanaza có mặt trong thành phần được đo bằng cách sử dụng 3% (trọng lượng:thể tích) xylan, tốt hơn là sử dụng 3% xylan birchwood, làm nền.
14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó hoạt tính xylanaza có mặt trong thành phần được đo sau 15 phút phản ứng.

MKILPSVLILLLGCVPVFESSQNVSLRELAEKLNIYIGFAAINNFWSLSDAEKYMEVARR
EFNILT PENQMKWDTIHPERDRYNFTPAEKHVEFAEENDMIVHGHTLVVHNQLPGWITG
REWTKEELLNVLEDHIKTVVSHFKGRVKIWDVVNEAVSDSGTYRESVWYKTIGPEYIEK
AFRWAKEADPDAILIYNDYSIEEINAKSNFVYNMIKELKEKGV PVDGIGFQM HIDYRGL
NYDSFRRLERFAKLGLQIYITEMDVRIPLSGSEEY LKKQAEVCAKIFDICLDNPAVK
AIQFWGFTDKYSWVPGFFKGYGKALLFDENYNPKPCYYAIKEVLEKKIEERK

FIG. 1

**FIG. 2****FIG. 2b**

**FIG. 3**

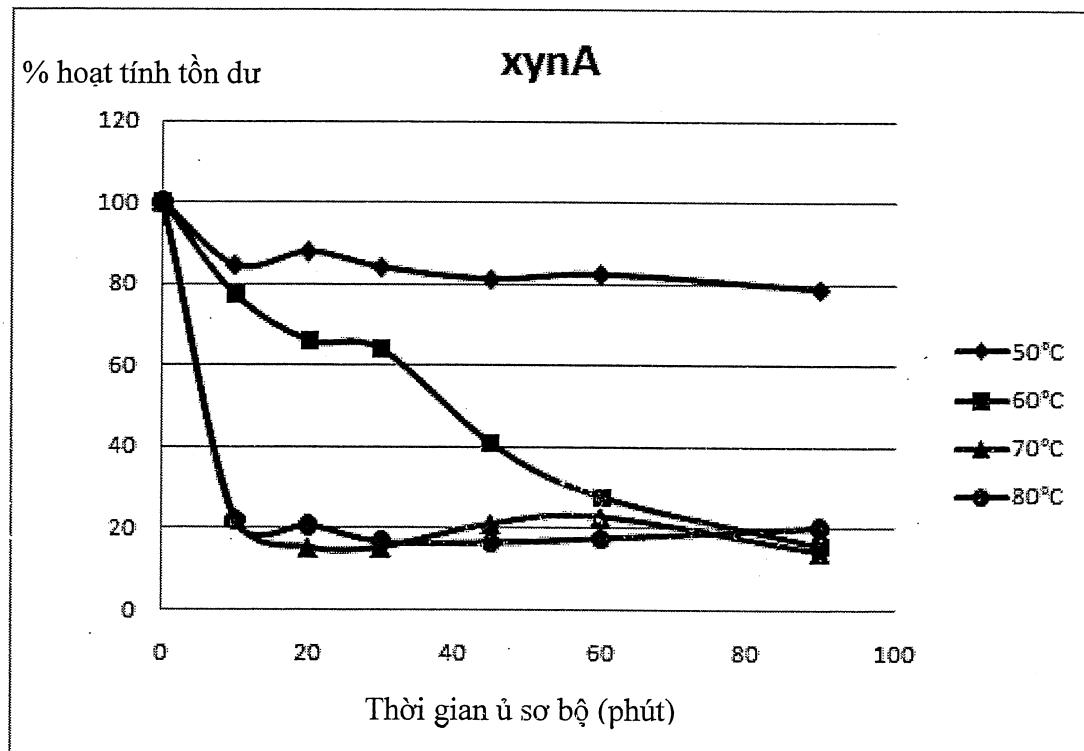
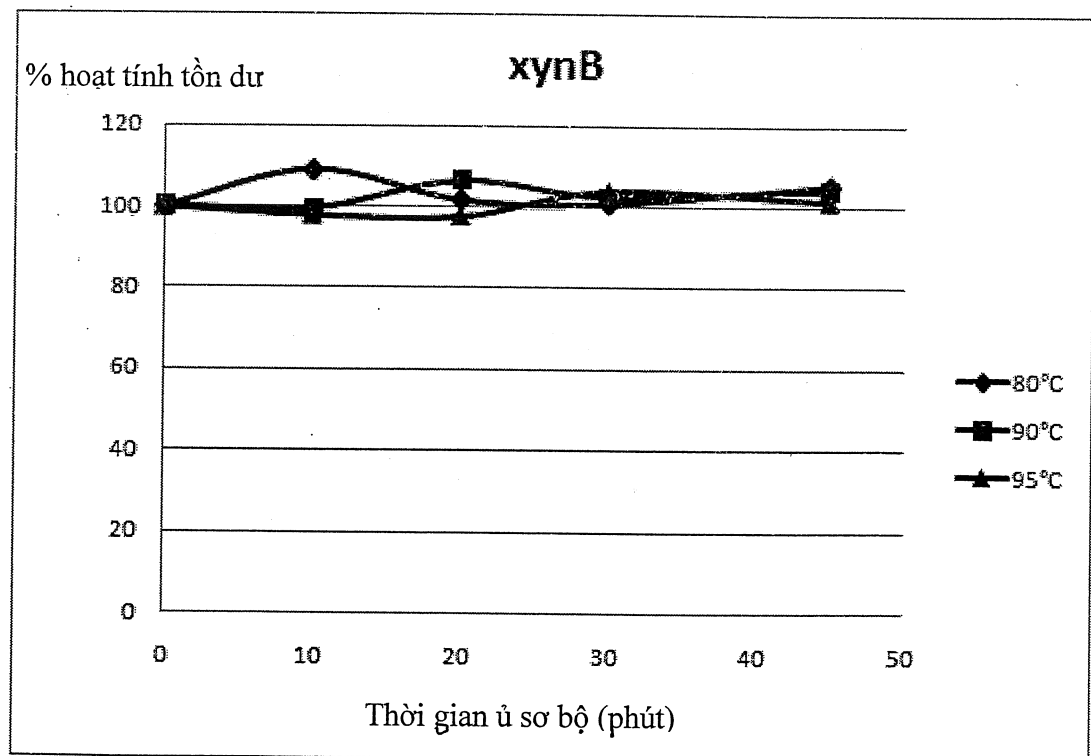


FIG. 4a

**FIG. 4b**

Danh mục trình tự

<110> Puratos NV

<120> Thức ăn cho động vật có bổ sung xylanaza và phong pháp sản xuất nó

<130> BPPura0052PC00

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 347

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(347)

<223> Chủng MSB8; GeneBank AAD35164.1

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(20)

<223> Peptit tín hiệu dự đoán

<400> 1

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

Val	Phe	Ser	Ser	Gln	Asn	Val	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Leu
			20					25					30		

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

Asp	Ala	Glu	Lys	Tyr	Met	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	Glu	Phe	Asn	Ile	Leu
	50					55					60				

Thr	Pro	Glu	Asn	Gln	Met	Lys	Trp	Asp	Thr	Ile	His	Pro	Glu	Arg	Asp
65					70					75					80

Arg	Tyr	Asn	Phe	Thr	Pro	Ala	Glu	Lys	His	Val	Glu	Phe	Ala	Glu	Glu
				85					90					95	

Asn	Asp	Met	Ile	Val	His	Gly	His	Thr	Leu	Val	Trp	His	Asn	Gln	Leu
			100					105					110		

Pro Gly Trp Ile Thr Gly Arg Glu Trp Thr Lys Glu Glu Leu Leu Asn
 115 120 125
 Val Leu Glu Asp His Ile Lys Thr Val Val Ser His Phe Lys Gly Arg
 130 135 140
 Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Glu Ser Val Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu
 165 170 175
 Lys Ala Phe Arg Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val
 195 200 205
 Tyr Asn Met Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Val Asp Gly
 210 215 220
 Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Asp Ser
 225 230 235 240
 Phe Arg Arg Asn Leu Glu Arg Phe Ala Lys Leu Gly Leu Gln Ile Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Ser Gly Ser Glu Glu Tyr
 260 265 270
 Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Cys Ala Lys Ile Phe Asp Ile Cys
 275 280 285
 Leu Asp Asn Pro Ala Val Lys Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp
 290 295 300
 Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys
 325 330 335
 Glu Val Leu Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys

340

345

<210> 2
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Thermotoga sp.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Chủng RQ2; GeneBank ACB09229.1

<220>
 <221> Tín hiệu
 <222> (1)..(20)
 <223> Peptit tín hiệu dự đoán

<400> 2

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

Val Phe Ser Ser Gln Asn Val Ser Leu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Leu
 20 25 30

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

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Arg Arg Glu Phe Asn Ile Leu
 50 55 60

Thr Pro Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asp
 65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Thr Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Glu Glu
 85 90 95

Asn Asn Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu
 100 105 110

Pro Gly Trp Ile Thr Gly Arg Glu Trp Thr Lys Glu Glu Leu Leu Asn
 115 120 125

Val Leu Glu Asp His Ile Lys Thr Val Val Ser His Phe Lys Gly Arg
 130 135 140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Tyr Arg Glu Ser Ile Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu
165 170 175

Lys Ala Phe Arg Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile
180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val
195 200 205

Tyr Asn Met Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Val Asp Gly
210 215 220

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Asp Ser
225 230 235 240

Phe Arg Arg Asn Leu Glu Arg Phe Ala Lys Leu Gly Leu Gln Ile Tyr
245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Ser Gly Ser Glu Glu Tyr
260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Cys Ala Lys Ile Phe Asp Ile Cys
275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Lys Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp
290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu
305 310 315 320

Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys
325 330 335

Glu Val Leu Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys
340 345

<210> 3
<211> 344
<212> PRT
<213> Thermotoga naphthophila

<220>
<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(344)

<223> Chủng RKU-10; GeneBank ADA66795.1

<220>

<221> Tín hiệu

<222> (1)..(20)

<223> Peptit tín hiệu dự đoán

<400> 3

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

Val Phe Ser Ser Gln Asn Val Ser Leu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Leu
 20 25 30

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

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Ile Ala Arg Arg Glu Phe Asn Ile Leu
 50 55 60

Thr His Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asp
 65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Thr Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Glu Glu
 85 90 95

Asn Gly Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu
 100 105 110

Pro Gly Trp Leu Thr Gly Arg Glu Trp Thr Arg Glu Glu Leu Leu Asn
 115 120 125

Val Leu Glu Asp His Ile Lys Thr Val Val Ser His Phe Lys Gly Arg
 130 135 140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Tyr Arg Glu Ser Val Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu
 165 170 175

Lys Ala Phe Arg Trp Ala Lys Glu Ala Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ile
 180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val
 195 200 205

Tyr Asn Met Ile Lys Glu Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Val Asp Gly
 210 215 220

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp His Arg Gly Leu Asn Tyr Asp Ser
 225 230 235 240

Phe Arg Arg Asn Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ile Tyr
 245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Ser Gly Ser Glu Glu Tyr
 260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Cys Ala Lys Ile Phe Glu Ile Cys
 275 280 285

Leu Lys Asn Pro Ala Val Lys Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp
 290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Tyr Ala Ile Lys
 325 330 335

Glu Val Leu Glu Lys Lys Arg Lys
 340

<210> 4
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Thermotoga neapolitana

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(346)
 <223> GeneBank CAA90235.1

<220>
 <221> Tín hiệu
 <222> (1)..(20)
 <223> Peptit tín hiệu dự đoán

<400> 4

Met 1	Lys	Gly	Leu	Pro 5	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu 10	Leu	Ile	Gly	Cys	Val 15	Ser
Ser	Phe	Gly	Ser 20	Gln	Asp	Val	Pro	Leu 25	Arg	Val	Leu	Ala	Glu 30	Lys	Leu
Asn	Ile	His 35	Ile	Gly	Phe	Ala	Ala 40	Gly	Asn	Asn	Phe	Trp 45	Ser	Leu	Pro
Asp	Ala 50	Glu	Lys	Tyr	Met	Glu 55	Val	Ala	Lys	Arg	Glu 60	Phe	Asn	Ile	Leu
Thr 65	Pro	Gly	Asn	Gln	Met 70	Lys	Trp	Asp	Thr	Ile 75	His	Pro	Glu	Arg	Asn 80
Arg	Tyr	Asn	Phe	Glu 85	Pro	Ala	Glu	Lys	His 90	Val	Glu	Phe	Ala	Leu 95	Lys
Asn	Asp	Met	Ile 100	Val	His	Gly	His	Thr 105	Leu	Val	Trp	His	Asn 110	Gln	Leu
Pro	Gly	Trp 115	Leu	Thr	Gly	Gln	Glu 120	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu 125	Leu	Leu	Asn
Ile 130	Leu	Glu	Asp	His	Val	Lys 135	Thr	Val	Val	Ser	His 140	Phe	Arg	Gly	Arg
Val 145	Lys	Ile	Trp	Asp	Val 150	Val	Asn	Glu	Ala	Val 155	Ser	Asp	Ser	Gly	Thr 160
Tyr	Arg	Glu	Ser	Ile 165	Trp	Tyr	Arg	Thr	Ile 170	Gly	Pro	Glu	Tyr	Ile 175	Glu
Lys	Ala	Leu	Ile 180	Trp	Ala	Lys	Glu	Ala 185	Asp	Pro	Asp	Ala	Ile 190	Leu	Ile
Tyr	Asn	Asp 195	Tyr	Asn	Ile	Glu	Glu 200	Ile	Asn	Ala	Lys	Ser 205	Asn	Phe	Val
Tyr	Asn 210	Met	Ile	Lys	Asn	Leu 215	Arg	Glu	Lys	Gly	Val 220	Pro	Ile	Asp	Gly
Ile 225	Gly	Phe	Gln	Met	His 230	Ile	Asp	Tyr	Arg	Gly 235	Ile	Asn	Tyr	Glu	Ser 240

Phe Lys Lys Asn Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ile Tyr
245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Arg Gly Phe Pro Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr
260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Tyr Arg Arg Ile Phe Glu Ile Cys
275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Arg Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp
290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu
305 310 315 320

Ile Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Phe Ala Ile Arg
325 330 335

Glu Leu Met Glu Glu Lys Leu Lys Glu Arg
340 345

```
<210> 5
<211> 346
<212> PRT
<213> Thermotoga sp. strain FjSS3-B.1
```

```
<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (1)..(346)
<223> GeneBank AAA90913.1
```

```
<220>
<221>    Tín hiệu
<222>    (1)..(20)
<223>    Peptit tín hiệu dự đoán
```

<400> 5

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

Ser Phe Gly Ser Gln Asp Val Pro Leu Arg Val Leu Ala Glu Lys Leu
20 25 30

Asn Ile His Ile Gly Phe Ala Ala Gly Asn Asn Phe Trp Ser Leu Pro
35 40 45

Asp Ala Glu Lys Tyr Met Glu Val Ala Lys Arg Glu Phe Asn Ile Leu
50 55 60

Thr Pro Glu Asn Gln Met Lys Trp Asp Thr Ile His Pro Glu Arg Asn
65 70 75 80

Arg Tyr Asn Phe Glu Pro Ala Glu Lys His Val Glu Phe Ala Leu Lys
85 90 95

Asn Asp Met Ile Val His Gly His Thr Leu Val Trp His Asn Gln Leu
100 105 110

Pro Gly Trp Leu Thr Gly Gln Glu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Leu Asn
115 120 125

Ile Leu Glu Asp His Val Lys Thr Val Val Ser His Phe Arg Gly Arg
130 135 140

Val Lys Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Glu Ser Ile Trp Tyr Lys Thr Ile Gly Pro Glu Tyr Ile Glu
165 170 175

Lys Ala Phe Ile Trp Ala Arg Glu Ala Asp Pro Asp Ala Val Leu Ile
180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Lys Ser Asn Phe Val
195 200 205

Tyr Asn Met Ile Lys Asn Leu Lys Glu Lys Gly Val Pro Ile Asp Gly
210 215 220

Ile Gly Phe Gln Met His Ile Asp Tyr Arg Gly Leu Asn Tyr Glu Ser
225 230 235 240

Phe Lys Lys Asn Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ile Tyr
245 250 255

Ile Thr Glu Met Asp Val Arg Ile Pro Leu Gly Gly Ser Glu Glu Tyr
260 265 270

Tyr Leu Lys Lys Gln Ala Glu Val Tyr Arg Arg Ile Phe Glu Ile Cys
275 280 285

Leu Asp Asn Pro Ala Val Arg Ala Ile Gln Phe Trp Gly Phe Thr Asp
290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Gly Phe Phe Lys Gly Tyr Gly Lys Ala Leu
305 310 315 320

Ile Phe Asp Glu Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Cys Tyr Phe Ala Ile Arg
325 330 335

Glu Leu Met Glu Glu Lys Leu Lys Glu Arg
340 345