



(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)



1-0036947

(51)⁷ A23F 5/24; C12N 9/24; A23F 5/36

(13) B

(21) 1-2016-00504

(22) 15/08/2014

(86) PCT/EP2014/067504 15/08/2014

(87) WO 2015/022428 19/02/2015

(30) 13180578.0 15/08/2013 EP

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/05/2016 338A

(73) NOVOZYMES A/S (DK)

Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark

(72) SPODSBERG, Nikolaj (DK); KROGH, Kristian Bertel Roemer M (DK); MONRAD, Rune Nygaard (DK); EKLOEF, Jens (SE); RASMUSSEN, Louise (DK); LYNGLLEV, Gitte Budolfson (DK); COULOMB, Laure (FR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT CHIẾT CÀ PHÊ VÀ CHẤT CHIẾT CÀ PHÊ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất chiết cà phê bao gồm việc sử dụng enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza và chất chiết cà phê chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất chiết cà phê nhờ sự hỗ trợ của enzym.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Các chất chiết cà phê được bán trên thị trường thường được sản xuất bằng cách xử lý nhiệt theo từng giai đoạn, kết hợp giai đoạn thẩm ướt, chiết và thủy phân, mà làm tan các chất rắn trong cà phê đã rang và xay với tỷ lệ phần trăm cao. Cần phải có nhiệt độ rất cao để có tác dụng lên quá trình thủy phân nhiệt và điều này có thể tạo ra các vị lạ và chi phí cao và tập trung nhiều vốn.

Việc sử dụng các enzym khác nhau trong phương pháp sản xuất chất chiết cà phê để cải thiện chất lượng sản phẩm và giảm chi phí sản xuất đã được đề xuất (tham khảo, ví dụ, US4,983,408, WO2007/011531, US57,141,83). Việc sử dụng mananaza trong phương pháp sản xuất chất chiết cà phê hòa tan đã được mô tả trong, ví dụ, WO2007/011531 và US5,714,183.

EP1600461A1 mô tả việc chiết arabinogalactan từ hạt cà phê sạch và đã được rang sử dụng enzym, trong đó arabinogalactan bị phân rã rất ít.

Việc tách dòng và biểu hiện exo-beta-1,3-galactanaza từ *Irpex lacteus* trong *Pichia pastoris* đã được mô tả trong tài liệu: Kotake et al. (2009), Biosci. Biotech. Biochem., 73:2303-2309.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là thu được chất chiết cà phê chứa các chất rắn hòa tan với hàm lượng cao.

Các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng phương pháp chiết cà phê nhờ sự hỗ trợ của enzym có thể làm tan các hydrat cacbon một cách chọn lọc và hiệu quả hơn so với các phương pháp thông thường. Phương pháp này có khả năng tiết kiệm số lượng hạt và làm giảm chi phí vận hành. Hơn nữa, bã thải bị enzym làm phân rã có thể khiến cho chúng có khả năng được sử dụng trong quá trình sản xuất etanol hoặc làm cơ chất cho đường/polyme. Do đó, phương pháp chiết cà phê nhờ sự hỗ trợ của enzym cũng có khả năng nâng cấp các sản phẩm phụ thu được từ phương pháp chiết này.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, việc ủ các hạt cà phê xay đã rang hoặc các hạt cà phê đã chiết một phần bằng β -1,3-galactanaza sẽ giải phóng hầu hết các chất rắn tan trong hạt cà phê. Kết quả thu được chỉ ra rằng, hiệu suất thu các chất rắn hòa tan cao hơn đáng kể khi sử dụng β -1,3-galactanaza so với β -1,4-galactanaza. Hiệu suất thu các chất rắn hòa tan ít nhất là bằng nhau khi ủ với β -1,3-galactanaza so với khi ủ với enzym mananaza, và đối với hầu hết các enzym β -1,3-galactanaza được thử nghiệm, hiệu suất thu các chất rắn hòa tan cao hơn so với khi ủ với enzym mananaza.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, việc ủ với enzym β -1,3-galactanaza giải phóng nhiều chất màu hơn trong mỗi chất khô so với việc ủ với enzym mananaza, tức là các chất chiết có vẻ bên ngoài sẫm màu hơn. Điều này có thể cho thấy các hợp chất tạo hương vị khi sử dụng enzym β -1,3-galactanaza so với enzym mananaza thì sẽ giải phóng nhiều hơn. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, điều này có thể là do việc giữ lại các hợp chất này bên trong ma trận galactan hoặc do sự có mặt của chúng trong các phức chất melanoidin được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt bằng β -1,3-galactanaza. Sự khác nhau về việc giải phóng các chất màu do cách xử lý bằng các enzym khác nhau được xác định bằng cách đo mức độ hấp thụ ở bước sóng 361nm. Nhưng sự khác nhau về màu sắc cũng có thể nhìn thấy được một cách rõ ràng trong chất chiết cà phê và có thể dễ dàng được phát hiện bằng mắt thường.

Tổng thành phần đường trong chất chiết được phân tích và kết quả cho thấy, việc ủ với enzym β -1,3-galactanaza làm tan hầu hết lượng oligosacarit chứa galactosa. Khi sử dụng enzym β -1,3-galactanaza có hoạt tính chủ yếu là endo- β -1,3-galactanaza,

phần lớn galactosa được giải phóng dưới dạng oligosacarit. Lượng oligosacarit cao hơn so với monosacarit trong chất chiết cà phê góp phần tạo độ nhớt và vị cao hơn. Hơn nữa, arabinogalactan oligosacarit trong chất chiết cà phê có thể có tác dụng lợi khuẩn.

Oligosacarit đã được hòa tan thu được từ quá trình ủ bã cà phê đã qua sử dụng bằng cách sử dụng beta-1,3-galactanaza được chỉ ra là có tỷ lệ giữa galactosa với arabinosa cao.

Sự phân bố theo phân tử lượng của các chất chiết cà phê được phân tích. Chất chiết cà phê thu được từ bột cà phê được ủ với enzym beta-1,3-galactanaza tạo ra các chất rắn trong cà phê có phân tử lượng trung bình cao hơn so với bột cà phê được ủ với enzym mananaza.

Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, việc loại bỏ mạch nhánh của cơ chất arabinogalactan khiến cho hoạt tính beta-1,3-galactanaza được sử dụng. Tức là, giảm số lượng các mạch nhánh của cơ chất làm tăng hoạt tính beta-1,3-galactanaza. Điều này liên quan đến quá trình xử lý cà phê rang bằng enzym do việc rang này sẽ loại bỏ các mạch nhánh của arabinogalactan trong hạt cà phê.

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

- a. chuẩn bị hạt cà phê rang và xay;
- b. thêm nước và enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza vào các hạt cà phê này;
- c. ủ để tạo ra chất chiết cà phê chứa nước; và
- d. tách riêng chất chiết cà phê khỏi các hạt cà phê đã chiết.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, hiệu suất thu các chất rắn hòa tan về cơ bản lớn hơn khi bột cà phê được ủ với cả enzym β -1,3-galactanaza và enzym mananaza. Hiệu suất thu cao hơn so với hiệu suất cộng lại khi lần lượt ủ với hai enzym này cho thấy tác dụng hiệp đồng. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, tác dụng hiệp đồng quan sát được có thể được giải thích là do galactomannan được kết hợp vào phức hợp galactan-protein-melanoidin trong các hạt cà phê.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, bước b. còn bao gồm việc bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

Theo một phương án được ưu tiên khác, hạt cà phê rang và xay đã chiết một phần. Các hạt cà phê này còn được gọi là bã cà phê.

Sáng chế còn đề cập đến chất chiết cà phê, trong đó chất chiết cà phê này:

- chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn hòa tan trong chất rắn tan trong cà phê;
- có hàm lượng galactosa tự do nhỏ hơn 50% khối lượng của tổng lượng galactosa;
- có tỷ lệ khối lượng giữa tổng galactosa và tổng arabinoza lớn hơn 3:1; và
- đặc trưng ở chỗ ít nhất 45% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5.

Theo một phương án được ưu tiên, chất chiết cà phê còn được đặc trưng ở chỗ, ít nhất 15% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 55.

Theo một phương án được ưu tiên khác, chất chiết cà phê chứa arabinogalactan oligosacarit có mức độ polyme hóa cao hơn 2 và thấp hơn 55 với lượng ít nhất bằng 15% tính theo tổng khối lượng của các chất rắn tan trong hạt cà phê.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “ β -1,3-galactanaza” hoặc “enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza” có nghĩa là enzym thủy phân đặc hiệu beta-1,3-galactan và beta-1,3-galactooligosacarit. Enzym này có thể có hoạt tính chủ yếu là endo- β -1,3-galactanaza (EC 3.2.1.181) hoặc nó có thể có hoạt tính exo (EC 3.2.1.145). Đối với các mục đích của sáng chế, hoạt tính β -1,3-galactanaza được xác định theo các phương pháp được mô tả trong các ví dụ. Theo một khía cạnh, β -1,3-galactanaza cần sử dụng 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 β -1,3-galactanaza của polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 2. Hoạt tính β -1,3-galactanaza có thể được định lượng

bằng cách sử dụng thử nghiệm đường khử (thử nghiệm PAH-BAH) được mô tả trong Ví dụ 7 với gồm arabic phân rã Smith hoặc gồm arabic được xử lý bằng axit để làm cơ chất.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, “mananaza” là beta-mananaza. Nó có thể là enzym được định nghĩa theo lĩnh vực này là mannan endo-1,4-beta-mannosidaza (EC 3.2.1.78) mà xúc tác sự thủy phân của các liên kết 1,4- β -D-mannosidic trong mannan, galactomannan và glucomannan, enzym này có các tên khác là 1,4- β -D-mannan mannano-hydrolaza; endo-1,4- β -mananaza; endo- β -1,4-mannaza; β -mananaza B; β -1,4-mannan 4-mannanohydrolaza; endo- β -mananaza; và β -D-mananaza. Đối với các mục đích của sáng chế, hoạt tính mananaza có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính được mô tả trong tài liệu: Staalbrand et al. (1993), Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*, J. Biotechnol., 29:229–42. Theo một khía cạnh, mananaza cần sử dụng 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 có số truy cập GENESEQP AXU66990 được thể hiện ở đây là SEQ ID NO:15.

Thuật ngữ “polypeptit trưởng thành” có nghĩa là polypeptit ở dạng cuối cùng sau dịch mã và các cải biến sau dịch mã bất kỳ, như xử lý đầu tận cùng N, cắt bỏ đầu tận cùng C, glycosyl hóa, phosphoryl hóa, v.v.. Theo một phương án, polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 2 là các axit amin ở vị trí 21 đến vị trí 256 trong SEQ ID NO: 2 dựa trên dự đoán peptit tín hiệu có 20 gốc bằng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6). Theo một phương án, polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 4 là các axit amin ở vị trí 26 đến vị trí 258 trong SEQ ID NO: 4 dựa trên dự đoán peptit tín hiệu có 25 gốc bằng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6). Theo một phương án, polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 8 là các axit amin ở vị trí 28 đến vị trí 265 trong SEQ ID NO: 8 dựa trên dự đoán peptit tín hiệu có 27 gốc bằng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6). Theo một phương án, polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 10 là các axit amin ở vị trí 21 đến vị trí 448 trong SEQ ID NO: 10 dựa trên dự đoán peptit tín hiệu có 20 gốc bằng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6). Đã biết trong lĩnh vực này là tế bào chủ có thể tạo ra hỗn hợp của hai trong nhiều polypeptit trưởng thành khác nhau (tức là, với axit amin đầu tận cùng

C và/hoặc đầu tận cùng N khác nhau) được biểu hiện bởi cùng một polynucleotit. Cũng đã biết trong lĩnh vực này là các tế bào chủ khác nhau có các polypeptit theo cách khác nhau, và do đó, một tế bào chủ biểu hiện polynucleotit có thể sản sinh polypeptit trưởng thành khác (ví dụ, có axit amin đầu tận cùng C và/hoặc đầu tận cùng N khác nhau) so với một tế bào chủ khác biểu hiện cùng polynucleotit đó.

Thuật ngữ “trình tự mã hóa polypeptit trưởng thành” có nghĩa là polynucleotit mã hóa polypeptit trưởng thành.

Độ tương đồng trình tự: mối liên hệ giữa hai trình tự axit amin được mô tả bởi thông số “Độ tương đồng trình tự”. Đối với các mục đích của sáng chế, độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói phần mềm EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản cao hơn. Các thông số được sử dụng là điểm phạt mở khoảng trống là 10, điểm phạt kéo dài khoảng trống là 0,5, và ma trận thay thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Kết quả của chương trình Needleman “Độ giống nhau dài nhất” được đánh dấu Needle (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn nobrief) được sử dụng để làm phần trăm giống nhau và được tính như sau:

$$(\text{Gốc giống nhau} \times 100) / (\text{chiều dài khi sắp thẳng hàng} - \text{tổng số lượng khoảng trống khi sắp thẳng hàng})$$

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

- chuẩn bị hạt cà phê rang và xay;
- thêm nước và enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza vào các hạt cà phê này;
- ủ để tạo ra chất chiết cà phê chứa nước; và
- tách riêng chất chiết cà phê khỏi các hạt cà phê đã chiết.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng vào hạt cà phê rang và xay mới hoặc bột cà phê đã rang mà được chiết bằng nước từ trước đó.

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

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng vào hạt cà phê đã xay thu được bằng cách xử lý cà phê hòa tan thông thường. Trong đó, cà phê rang thường được xay và chiết (bằng nhiệt) với nước trong nhiều giai đoạn. Quá trình thực hiện theo hai giai đoạn là điển hình trong lĩnh vực này, trong đó giai đoạn thứ nhất bao gồm bước thẩm ướt bột cà phê, thu hồi hương vị và chiết các thành phần hòa tan sẵn (như cafein, khoáng chất và các monosacarit). Giai đoạn thứ hai thường là giai đoạn thủy phân, trong đó cà phê dạng polyme sinh học lớn và các thành phần liên kết bị phá vỡ thành các polyme hòa tan được trong nước nhỏ hơn. Trong giai đoạn thứ nhất, cà phê rang thường được chiết bằng nước ở nhiệt độ 100°C hoặc thấp hơn. Bột từ chất chiết này, có thể được gọi là "bột trong môi trường", sau đó được chiết bằng nước được đun quá nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 140°C đến 180°C hoặc thậm chí cao hơn. Bột được chiết một phần từ chất chiết quá nhiệt có thể được gọi là "bột quá nhiệt".

Nếu phương pháp theo sáng chế được áp dụng vào bột được chiết một phần, lần chiết thứ nhất có thể được tiến hành bằng cách bổ sung cà phê rang và xay mà có thể có cỡ hạt trung bình là khoảng 900 micron vào bình đã khuấy có vỏ bọc chứa nước, trong đó tỷ lệ giữa các chất rắn với nước là khoảng 1:5. Huyền phù đặc này được khuấy, làm nóng gián tiếp đến nhiệt độ nhỏ hơn khoảng 140°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 85 đến 90°C, và duy trì ở nhiệt độ này trong thời gian khoảng 30 phút. Huyền phù đặc này sau đó được loại bỏ khỏi bình và bã và chất chiết thu được được tách riêng bằng cách sử dụng bộ lọc. Bã được chiết một phần được đưa vào phương pháp theo sáng chế và chất chiết được tạo ra trong lần chiết thứ nhất có thể được trộn với chất chiết thứ hai được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, hạt cà phê xay được chiết một phần hoặc bã cà phê được chiết một phần có nghĩa là hạt cà phê đã xay được đưa vào quá trình chiết ít nhất một lần. Hạt cà phê xay đã chiết một phần như vậy cũng có thể được gọi là bã cà phê.

Phương pháp theo sáng chế có thể, nói chung là, được áp dụng vào cà phê rang và xay bao gồm các hạt đã rang mà được xay đến cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5 mm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,9 mm.

Ngoài ra, bước xử lý sơ bộ kiểm soát hương vị có thể được thêm vào phương pháp theo sáng chế để thu hồi các hợp chất thơm hoặc thành phần thơm của cà phê trước giai đoạn chiết và/hoặc thủy phân. Các phương pháp xử lý hữu dụng bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong tài liệu EP 0 489 401. Quá trình thực hiện trên thực tế bao gồm bước thấm ướt cà phê rang và xay bằng nước trong bình với tỷ lệ là khoảng 1:0,5 khối lượng. Áp dụng chân không vào bình (ví dụ, khoảng 150mbar) và sau đó áp dụng hơi áp suất thấp vào tầng bột đã thấm ướt trong thời gian lên đến 4 đến 8 phút để làm bay hơi các hợp chất thơm khỏi cà phê rang và xay. Các hợp chất dễ bay hơi đã hút được ngưng tụ, ví dụ, ở nhiệt độ khoảng 5°C và duy trì để được bổ sung trở lại vào chất chiết hoặc các chất rắn được chiết.

Phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện trên cà phê rang mà đã xông hơi vào-xả hơi ra ở áp suất thấp để chiết các thành phần hương vị dễ bay hơi, như nêu trên.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng vào loại bột cà phê bất kỳ với chất thủy phân đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, như bột cà phê đã khử dầu, bột cà phê đã khử cafein, bột cà phê được nghiền ướt, v.v..

Quá trình xử lý hạt cà phê rang và xay bằng enzym cần được tiến hành ở nhiệt độ mà các enzym này có hoạt tính và trong thời gian đủ lâu để cho phép phản ứng enzym.

Theo một kiểu vận hành theo mẻ có thể có, sau khi phản ứng enzym gần như được hoàn thành, hỗn hợp này được đưa vào tách toàn phần, để, ví dụ, ly tâm hoặc lọc bằng đai, mà loại bỏ hầu hết các chất rắn không hòa tan. Chất chiết đã tách, vẫn chứa các hạt mịn, dầu và protein enzym, được tái tuần hoàn qua thiết bị màng chảy chéo, mà loại bỏ tất cả các chất không hòa tan và cũng có thể loại bỏ enzym. Phần lớn hoặc tất cả enzym vẫn còn trong chất không thấm qua màng và có thể được tái sử dụng vào phản ứng.

Theo một kiểu vận hành theo mẻ có thể có, chất thấm qua màng bán thấm được rút ra liên tục trong phản ứng enzym, tức là một phần của hỗn hợp phản ứng tiếp tục được tuần hoàn thông qua tế bào tách màng bán thấm chảy chéo. Phương pháp này có thể được vận hành theo kiểu nửa liên tục, trong đó các chất thấm qua màng được rút ra cho đến khi thể tích trong bình phản ứng giảm đi đến điểm mà mức độ làm giảm độ nhớt hoặc áp suất của nó trở nên cao. Tại điểm này, một số chất không thấm được thải ra và tầng huyền phù đặc chứa cà phê sạch và một số enzym mới được bổ sung. Chất không thấm đã thải có thể được loại bỏ hoặc có thể được rửa để thu hồi enzym mà sau

đó được tái sử dụng. Enzym trong chất không thấm còn lại (không được thải) được giữ lại và tái sử dụng.

Theo một cách khác, huyền phù đặc làm nguyên liệu mới có thể tiếp tục được thêm vào bình nguyên liệu cùng với một số enzym với bộ phận hút thải từ dòng tái sử dụng có thể tích bằng nhau.

Trong một số sự kiện, việc vận hành phương pháp này theo kiểu vận hành liên tục hoặc nửa liên tục cho phép thấm các thành phần được hòa tan ra khỏi vùng phản ứng trước khi chúng có thể bị phá hủy hơn nữa.

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

Nếu bột trong môi trường được sử dụng để làm nguyên liệu cho phương pháp theo sáng chế, chất chiết được tạo ra có thể được kết hợp với chất chiết thu được trong giai đoạn chiết trong môi trường. Các chất chiết được kết hợp dựa trên tỷ lệ giữa sản lượng rang đã chiết từ từng giai đoạn. Chất chiết đã kết hợp sau đó được cô, tạo mùi thơm và làm khô như thông thường trong lĩnh vực này.

Chất chiết cà phê có thể được tách nước, như cà phê hòa tan hoặc hỗn hợp chế phẩm khô, hoặc nó có thể là sản phẩm cà phê uống liền, chế phẩm hỗn hợp dạng lỏng, chế phẩm đông lạnh hoặc chế phẩm cô dạng lỏng. Chất chiết cà phê theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các ứng dụng không phải đồ uống, như món tráng miệng dùng ngay hoặc sản phẩm bánh kẹo v.v..

Các phương pháp tạo ra các chế phẩm cà phê từ chất chiết cà phê hòa tan như vậy là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Trong phương pháp theo sáng chế, nước và enzym được bổ sung vào hạt cà phê mà có thể đã chiết một phần.

Nước có thể, ví dụ, được bổ sung sao cho nồng độ cuối cùng của chất khô là nằm trong khoảng từ 2% đến 30% (thể tích/thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5% đến 20% (thể tích/thể tích), như khoảng 10% (thể tích/thể tích).

Enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có thể được bổ sung ở nồng độ ít nhất là 0,001g protein enzym/kg hạt cà phê, tốt hơn là ít nhất 0,005g protein enzym/kg hạt cà

phê, như ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,5g protein enzym/kg hạt cà phê, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,2g protein enzym/kg hạt cà phê.

Enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza tốt hơn là được bổ sung để làm chế phẩm enzym đặc trưng ở chỗ, ít nhất 5%, tốt hơn là ít nhất 10% hoặc ít nhất 20%, tổng protein trong chế phẩm là enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza làm hoạt tính enzym chủ yếu của nó.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có hoạt tính ở nhiệt độ 60°C mà ít nhất bằng 50%, tốt hơn là ít nhất bằng 60% hoặc ít nhất bằng 70%, hoạt tính của nó ở nhiệt độ 40°C. Hoạt tính này ở các nhiệt độ khác nhau có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 11.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có hoạt tính tương đối để làm phân rã gồm arabic phân rã Smith mà ít nhất là cao hơn 10 lần so với hoạt tính tương đối để làm phân rã gồm Arabic của nó. Hoạt tính tương đối để làm phân rã các cơ chất có mức độ phân nhánh khác nhau này có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 6-7.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là β -1,3-galactanaza, tốt hơn là endo- β -1,3-galactanaza (EC 3.2.1.181) hoặc exo- β -1,3-galactanaza (EC 3.2.1.145). Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là endo- β -1,3-galactanaza (EC 3.2.1.181). Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là exo- β -1,3-galactanaza (EC 3.2.1.145).

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza chủ yếu có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là β -1,3-galactanaza của họ GH16.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 60% so với trình tự trưởng thành của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 8. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với trình tự trưởng thành của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 8. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit trưởng thành của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 8.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 2. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với trình tự trưởng thành của trình tự bất kỳ SEQ ID NO: 2. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 4. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 4. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 8. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với trình tự trưởng

thành của SEQ ID NO: 8. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là β -1,3-galactanaza của họ GH43.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 10. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với trình tự trưởng thành của SEQ ID NO: 10. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 10.

β -1,3-galactanaza cần sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể thu được từ các vi sinh vật của loài bất kỳ. Đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ “thu được từ” như được sử dụng ở đây kết hợp với nguồn được nêu có nghĩa là polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được sản sinh từ nguồn này hoặc từ chủng mà trong đó polynucleotit từ nguồn này đã xen vào. Theo một phương án, β -1,3-galactanaza thu được từ nguồn được nêu được tiết ngoài tế bào.

β -1,3-galactanaza có thể là β -1,3-galactanaza của vi khuẩn. Ví dụ, β -1,3-galactanaza có thể là β -1,3-galactanaza của vi khuẩn Gram dương như β -1,3-galactanaza của *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, hoặc β -1,3-galactanaza của *Streptomyces*, hoặc vi khuẩn Gram âm như β -1,3-galactanaza của *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, hoặc *Ureaplasma*.

β -1,3-galactanaza có thể là β -1,3-galactanaza của nấm. Ví dụ, β -1,3-galactanaza có thể là β -1,3-galactanaza của nấm men như β -1,3-galactanaza của *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Yarrowia*; hoặc β -1,3-galactanaza của nấm sợi như β -1,3-galactanaza của *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, Pseudotriconympha, Rhizomucor, Schizophyllum, Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella, hoặc Xylaria.

Theo một phương án, β -1,3-galactanaza thu được từ *Auricularia*, tốt hơn là từ *Auricularia delicata*.

Theo một phương án, β -1,3-galactanaza thu được từ *Magnaporthe*, tốt hơn là từ *Magnaporthe oryzae*.

Theo một phương án, β -1,3-galactanaza thu được từ *Neurospora*, tốt hơn là từ *Neurospora crassa*.

Theo một phương án, β -1,3-galactanaza thu được từ *Irpex*, tốt hơn là từ *Irpex lacteus*.

Nên hiểu rằng, đối với các loài nêu trên, sáng chế bao gồm cả trạng thái hoàn hảo và không hoàn hảo, và các sáng chế tương đương theo phân loại khác, ví dụ, các dạng tiệm biến, bất kể tên các loài mà chúng đã biết nhờ các tên này. Các chuyên gia trong lĩnh vực này dễ dàng nhận ra tính tương đồng của các đơn tương đương thích hợp.

Các giống của các loài này dễ dàng tiếp cận công khai trong một số bộ sưu tập giống, như bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection) (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), và bộ sưu tập giống gốc theo dịch vụ nghiên cứu nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection), Trung tâm nghiên cứu miền Bắc (Northern Regional Research Center) (NRRL).

β -1,3-galactanaza có thể được nhận biết và thu được từ các nguồn khác nhau bao gồm các vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên (ví dụ, đất trồng, phân trộn, nước,

v.v..) hoặc các mẫu ADN thu được trực tiếp từ các vật liệu tự nhiên (ví dụ, đất trồng, phân trộn, nước, v.v..) bằng cách sử dụng các đầu dò thích hợp. Các kỹ thuật để phân lập vi sinh vật và ADN trực tiếp từ các môi trường tự nhiên đã biết rõ trong lĩnh vực này. Polynucleotit mã hóa β -1,3-galactanaza sau đó có thể thu được bằng cách sàng lọc một cách tương tự thư viện ADN hoặc ADN bổ trợ của hệ gen của một vi sinh vật khác hoặc mẫu ADN đã trộn. Một khi đã phát hiện ra polynucleotit mã hóa β -1,3-galactanaza bằng (các) đầu dò, polynucleotit có thể được phân lập hoặc tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này (tham khảo, ví dụ, Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York).

Theo một phương án về phương pháp theo sáng chế, bước b. còn bao gồm việc bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

Mananaza được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể thu được từ các vi sinh vật của loài bất kỳ. Mananaza đã nhận biết, ví dụ, trong một vài sinh vật *Bacillus*. Ví dụ, Talbot *et al.* (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56, No. 11, pp. 3505-3510, mô tả beta-mananaza có nguồn gốc từ *Bacillus stearothermophilus* có độ pH tối ưu là nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5. Mendoza *et al.* (1994), *World J. Microbiol. Biotech.*, Vol. 10, No. 5, pp. 551-555, mô tả beta-mananaza có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* có hoạt tính tối ưu ở độ pH = 5,0 và nhiệt độ 55°C. JP-03047076 mô tả beta-mananaza có nguồn gốc từ *Bacillus* sp., có độ pH tối ưu từ 8 đến 10. JP-63056289 mô tả phương pháp sản xuất beta-mananaza kiềm ổn định nhiệt. JP-08051975 mô tả beta-mananaza kiềm có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. AM-001 ưa kiềm. Mananaza đã tinh chế từ *Bacillus amyloliquefaciens* được mô tả trong tài liệu WO 97/11164. WO 94/25576 mô tả enzym từ *Aspergillus aculeatus*, CBS 101.43, biểu hiện hoạt tính mananaza và WO 93/24622 mô tả mananaza được phân lập từ *Trichoderma reesei*.

Chế phẩm mananaza bán trên thị trường thích hợp là Mannaway® được sản xuất bởi Novozymes A/S.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính mananaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% so với SEQ ID NO: 15. Tốt hơn là, enzym có hoạt tính mananaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 65%, ví dụ, 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%, so với SEQ ID NO: 15. Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính mananaza khác lên đến 10 axit amin, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin, so với polypeptit của SEQ ID NO: 15.

Theo một phương án, mananaza thu được từ chủng của loài *Bacillus*.

Theo một phương án, mananaza là mananaza có trình tự axit amin GENE-SEQP:AXU66990 được mô tả trong tài liệu WO2010000858.

Theo một phương án về phương pháp theo sáng chế, enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza và enzym có hoạt tính mananaza tác dụng theo cách hiệp đồng để làm tăng lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Trong phương pháp theo sáng chế, sau khi nước và enzym được thêm vào hạt cà phê rang và xay, chế phẩm chứa các hạt cà phê, nước và enzym được ủ để tạo ra chất chiết cà phê chứa nước.

Việc ủ được tiến hành ở nhiệt độ mà các enzym có hoạt tính, thường là trong khoảng nhiệt độ từ 25°C đến 90°C, tốt hơn là từ 35°C đến 70°C trong khoảng thời gian từ khoảng 1 đến 24 giờ, tốt hơn là từ khoảng 4 đến 24 giờ để cho phép enzym phản ứng.

Sau khi ủ, chất chiết cà phê được tách riêng khỏi các hạt cà phê đã chiết bằng phương tiện bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê. Tốt hơn là, chất chiết cà phê chứa ít nhất 25% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Tổng galactosa trong chất chiết cà phê trong ngữ cảnh của sáng chế có nghĩa là galactosa tự do được hòa tan cộng với galactosa liên kết trong oligosacarit được hòa tan.

Theo một phương án, hàm lượng galactosa tự do trong chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế là nhỏ hơn 50% khối lượng của tổng hàm lượng galactosa. Tốt hơn là, hàm lượng galactosa tự do là nhỏ hơn 40% khối lượng, tốt hơn là nhỏ hơn 30% hoặc nhỏ hơn 25% khối lượng, của tổng hàm lượng galactosa. Theo

một phương án, hàm lượng galactosa tự do là nhỏ hơn 20% khối lượng, tốt hơn là nhỏ hơn 15% hoặc nhỏ hơn 10% khối lượng, của tổng hàm lượng galactosa.

Theo một phương án, chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ khối lượng giữa tổng galactosa với tổng arabinoza lớn hơn 3:1, tốt hơn là lớn hơn 4:1 hoặc lớn hơn 5:1.

Tổng arabinoza trong chất chiết cà phê trong ngữ cảnh của sáng chế có nghĩa là arabinoza tự do được hòa tan cộng với arabinoza liên kết trong oligosacarit được hòa tan.

Theo một phương án, chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ ít nhất 45% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5. Tốt hơn là, ít nhất 50% khối lượng, ví dụ, ít nhất 55% hoặc ít nhất 60% khối lượng, của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5.

Theo một phương án, chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế đặc trưng ở chỗ, ít nhất 15% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 55. Tốt hơn là, ít nhất 15% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 45, ví dụ, nhỏ hơn 35 hoặc nhỏ hơn 25.

Theo một phương án, chất chiết cà phê thu được bằng phương pháp theo sáng chế chứa arabinogalactan oligosacarit có mức độ polyme hóa cao hơn 2 và thấp hơn 55 với lượng ít nhất bằng 15% tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất chiết cà phê:

- a. chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng của chất rắn cà phê hòa tan;
- b. có hàm lượng galactosa tự do nhỏ hơn 50% khối lượng của tổng lượng galactosa;
- c. có tỷ lệ khối lượng giữa tổng galactosa với tổng arabinoza lớn hơn 3:1; và
- d. được đặc trưng ở chỗ, ít nhất 45% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5.

Theo một phương án, chất chiết cà phê chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê. Tốt hơn là, chất chiết cà phê chứa ít nhất 25% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Theo một phương án, hàm lượng galactosa tự do trong chất chiết cà phê nhỏ hơn 40% khối lượng, tốt hơn là nhỏ hơn 30% hoặc nhỏ hơn 25% khối lượng, của tổng hàm lượng galactosa. Theo một phương án, hàm lượng galactosa tự do là nhỏ hơn 20% khối lượng, tốt hơn là nhỏ hơn 15% hoặc nhỏ hơn 10% khối lượng, của tổng hàm lượng galactosa.

Theo một phương án, chất chiết cà phê có tỷ lệ khối lượng giữa tổng galactosa với tổng arabinoza lớn hơn 4:1 hoặc lớn hơn 5:1.

Theo một phương án, chất chiết cà phê đặc trưng ở chỗ ít nhất 50% khối lượng, ví dụ, ít nhất 55% hoặc ít nhất 60% khối lượng, phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5.

Theo một phương án được ưu tiên, chất chiết cà phê còn được đặc trưng ở chỗ ít nhất 15% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 55. Tốt hơn là, ít nhất 15% khối lượng của phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 45, ví dụ, nhỏ hơn 35 hoặc nhỏ hơn 25.

Theo một phương án được ưu tiên khác, chất chiết cà phê chứa arabinogalactan oligosacarit có mức độ polyme hóa cao hơn 2 và thấp hơn 55 với lượng ít nhất bằng 15% dựa trên tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp

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

SEQ ID NO:	Ví dụ	Mô tả	Nguồn gốc	GH
2	Ví dụ 1	Endo- β -1,3-galactanaza	<i>Auricularia delicata</i>	GH16
4	Ví dụ 2	Endo- β -1,3-galactanaza	<i>Magnaporthe oryzae</i>	GH16

8	Ví dụ 3	Endo- β -1,3-galactanaza	<i>Neurospora crassa</i>	GH16
10	Ví dụ 4	Exo- β -1,3-galactanaza	<i>Irpex lacteus</i>	GH43
12	Ví dụ 5	Endo- β -1,4-galactanaza	<i>Ignisphaera aggregans</i>	GH53

Enzym mananaza được sử dụng trong các ví dụ là Mannaway® 25L.

Vật liệu

Các hóa chất được sử dụng làm dung dịch đệm và cơ chất là các sản phẩm bán trên thị trường có phẩm cấp ít nhất là dùng làm chất thử.

Môi trường và dung dịch

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

Các đĩa thạch PDA gồm dịch ngâm khoai tây (dịch ngâm khoai tây được tạo ra bằng cách luộc 300g khoai tây cắt lát (rửa nhưng không gọt vỏ) trong nước trong thời gian 30 phút và sau đó gạn hoặc lọc nước luộc qua vải thưa. Sau đó, bổ sung nước cất vào cho đến khi tổng thể tích của hỗn dịch là một lít, tiếp theo là bổ sung 20g dextroza và 20g bột thạch. Môi trường được vô trùng bằng cách hấp ở 15psi trong thời gian 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

Các đĩa LB gồm có 10g Bacto-Trypton, 5g chất chiết nấm men, 10g natri clorua, 15g thạch Bacto, và nước được khử ion xuống thể tích còn 1 lít. Môi trường được vô trùng bằng cách hấp tiệt trùng ở áp suất 15psi trong thời gian 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

Các đĩa sucroza COVE gồm có 342g sucroza (Sigma S-9378), 20g bột thạch, 20ml dung dịch muối Cove (26g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 26g KCl, 26g KH_2PO_4 , 50ml dung dịch kim loại vi lượng Cove) và nước được khử ion xuống thể tích còn 1 lít), và nước được khử ion xuống thể tích còn 1 lít). Môi trường được vô trùng bằng cách hấp tiệt trùng ở áp suất 15psi trong thời gian 15 phút (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998). Môi trường được làm nguội xuống nhiệt độ 60°C và bổ sung axetamit 10mM, CsCl 15mM, Triton X-100 (50 μ l/500ml)).

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

Ví dụ 1: Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Auricularia delicata* (GALACTANAZA1)

Tổ hợp hệ gen của *Auricularia delicata* SS-5 (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, Mỹ) được lấy ra từ NCBI, Bethesda MD, Mỹ, cùng với các mô hình gen tương ứng và được sử dụng để làm điểm bắt đầu để phát hiện các chất tương đồng GH16 trong hệ gen. Các mô hình gen chính xác hơn được xây dựng thủ công bằng cách sử dụng các trình tự protein GH16 đã biết để làm chỉ dẫn.

Xây dựng cấu trúc vector biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự ADN bổ trợ của *Auricularia delicata* mã hóa polypeptit họ GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Dựa trên trình tự nucleotit của trình tự hệ gen SS-5 của *Auricularia delicata* (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, Mỹ), gen tổng hợp P24GUG (SEQ ID NO: 1) thu được từ GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) mã hóa ADN bổ trợ của endo-beta-1,3-galactanaza trong *Auricularia delicata* có vị trí giới hạn bổ sung BamHI và XhoI để hỗ trợ việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Cấu trúc GeneArt chứa P24GUG được xử lý bằng enzyme giới hạn BamHI và XhoI và các sản phẩm phản ứng được phân lập bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng bazơ Tris 40mM, natri axetat 20mM, dung dịch đệm dinatri EDTA 1mM (TAE), trong đó dải sản phẩm 780bp được cắt ra từ gel này và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế dải gel và ADN illustra GFX® PCR (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Mảnh này sau đó được tách dòng bằng cách nối vào pDau109 được phân cắt bằng Bam HI và Xho I bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất để tạo ra plasmit pP24GUG. Việc tách dòng gen P24GUG vào pDau109 được phân cắt bằng Bam HI-Xho I dẫn đến sự phiên mã gen P24GUG của *Auricularia delicata* dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu kép NA2-tpi. NA2-tpi là đoạn khởi đầu được cải biến từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger* mà trong đó trình tự dẫn không được dịch mã được thay thế

bằng trình tự dẫn không được dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphat isomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Plasmit pP24GUG đã nối được biến nạp vào các tế bào *E. coli* cạnh tranh hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất và được chuyển lên các đĩa LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm, các khuẩn lạc được thấy là sinh trưởng chọn lọc trên các đĩa LB ampixilin. Hai khuẩn lạc được biến nạp bằng cấu trúc P24GUG GH16 được nuôi cấy trong môi trường LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml và plasmit được phân lập bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất.

Plasmit đã phân lập được giải trình tự sử dụng các đoạn môi vector và các đoạn môi đặc hiệu gen P24GUG để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmit điển hình mà không có sai số.

Phân tích đặc tính của trình tự ADN bổ trợ của *Auricularia delicata* mã hóa polypeptit GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Việc giải trình tự ADN của dòng vô tính ADN bổ trợ GH16 P24GUG của *Auricularia delicata* được thực hiện bằng máy đọc trình tự ADN tự động Applied Biosystems 3700 Model sử dụng phiên bản 3.1 BIG-DYE™ terminator chemistry (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Mỹ) và phương pháp di chuyển đoạn môi. Dữ liệu về trình tự nucleotit được nghiên cứu kỹ về chất lượng và tất cả các trình tự được so sánh với nhau nhờ sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, Mỹ).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của gen P24GUG của *Auricularia delicata* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Trình tự mã hóa gồm 771 cặp bazơ bao gồm codon kết thúc. Protein dự đoán được mã hóa là 256 axit amin. Bằng cách sử dụng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu có 20 gốc được dự đoán. Protein trưởng thành được dự đoán chứa 236 axit amin với phân tử lượng được dự đoán là 26 kDa và độ pH đẳng điện là 7,3.

Sự biểu hiện endo- β -1,3-galactanaza GH16 của *Auricularia delicata* (GALACTANAZA1)

Plasmid biểu hiện pP24GUG được biến nạp vào MT3568 của *Aspergillus oryzae*. MT3568 của *Aspergillus oryzae* là dẫn xuất được phá vỡ AMDS (axetamidaza) của JaL355 (WO 02/40694), trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động pyrG được khôi phục trong quá trình bất hoạt gen axetamidaza (AMDS) của *Aspergillus oryzae*. Các thể nguyên sinh MT3568 được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong patent châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp vào đây để tham khảo.

Các thể biến nạp được tinh chế trên các đĩa chọn lọc sucroza COVE qua hạt dính duy nhất trước khi tạo bào tử chúng trên các đĩa PDA. Việc sản xuất polypeptit GH16 của *Auricularia delicata* nhờ các thể biến nạp này được phân tích từ các phần dịch nổi nuôi cấy của môi trường nuôi cấy tĩnh có 96 lỗ sâu 1ml ở nhiệt độ 30°C trong YP+môi trường glucoza 2%. Việc biểu hiện được xác nhận trên gel 48 lỗ E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) bằng cách nhuộm Coomassie. Một thể biến nạp được chọn để nghiên cứu thêm và được ký hiệu là *Aspergillus oryzae* 99.1.

Để sản xuất trên quy mô lớn, các bào tử *Aspergillus oryzae* 99.1 được dàn trên đĩa PDA và ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C. Đĩa bào tử hợp dòng được rửa hai lần bằng 5ml TWEEN® 20 0,01% để tối đa hóa số lượng các bào tử được gom. Hỗn dịch chứa bào tử sau đó được sử dụng để cấy truyền mười lăm bình dung tích 500ml chứa 150ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc không đổi là 100 vòng/phút. Vào ngày thứ tư sau khi cấy truyền, môi trường nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua máy lọc bottle top MF75 Supor MachV 0,2 μ m PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Môi trường nuôi cấy mới từ thể biến nạp này tạo ra dải protein GH16 khoảng 26 kDa. Độ tương đồng của dải như polypeptit GH16 của *Auricularia delicata* được xác nhận bằng cách giải trình tự peptit.

Tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Auricularia delicata* (GALACTANAZA1)

Môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch của GALACTANAZA1 của *Auricularia delicate* được bổ sung amoni sulphat đến nồng độ cuối cùng là 2M và độ pH được điều chỉnh đến 7,5. Sau đó, mẫu này được nạp lên cột kỵ nước (tàng được đóng gói chứa viên butyl Toyo; gradien: 0-100% B trong 10 thể tích cột; dung dịch đệm A:

Mes 50mM và amoni sulphat 2M; dung dịch đệm B: Mes 50mM). SDS-PAGE (các điều kiện khử) xác nhận rằng galactanaza không được rửa giải qua cột trong phân đoạn chảy qua hoặc phân đoạn rửa. Dựa trên SDS-PAGE, các phân đoạn chứa protein có Mw được mong đợi là 27,7kDa (phân đoạn 30-50) được gộp lại, được cô và được trao đổi dung dịch đệm thành dung dịch đệm natri axetat 20mM có độ pH = 6,5 bằng cách ly tâm trong màng MWCO cột xoay vivaspin 3kDa (ly tâm xoay ở tốc độ 30000 m/s²).

Ví dụ 2. Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Magnaporthe oryzae* (GALACTANAZA2)

Xây dựng cấu trúc vectơ biểu hiện của *Aspergillus oryzae* chứa trình tự ADN bổ trợ của *Magnaporthe oryzae* mã hóa polypeptit họ GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Tổ hợp sơ bộ của hệ gen của *Magnaporthe oryzae* 70-15 (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, Mỹ) được phân tích bằng cách sử dụng GeneMark v2.3c (Georgia Tech's Center for Bioinformatics and Computational Genomics, Atlanta, Georgia, Mỹ). Các mô hình gen được xây dựng bằng phần mềm này được sử dụng để làm điểm bắt đầu để phát hiện các chất tương đồng GH16 trong hệ gen. Các mô hình gen chính xác hơn được xây dựng thủ công bằng cách sử dụng các trình tự protein GH16 đã biết để làm chỉ dẫn. Một trình tự thu được là giống với Swissprot entry A4QYM3 được chú thích là protein không được đặc trưng giả định của GH16.

Dựa trên trình tự nucleotit của trình tự hệ gen 70-15 *Magnaporthe oryzae* (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, United Kingdom), gen tổng hợp P24HNK (SEQ ID NO: 3) thu được từ GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) mã hóa ADN bổ trợ của endo-beta-1,3-galactanaza của *Magnaporthe oryzae* có vị trí giới hạn bổ sung BamHI và XhoI để hỗ trợ việc tách dòng vào vectơ biểu hiện.

Cấu trúc GeneArt chứa P24HNK được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI và XhoI và các sản phẩm phản ứng được phân lập bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng bazơ Tris 40mM, natri axetat 20mM, dung dịch đệm dinatri EDTA 1mM (TAE) mà dải sản phẩm 790bp được cắt ra từ gel và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế dải gel và ADN illustra GFX® PCR (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Mảnh này sau đó được tách dòng bằng cách nối vào pDau109 được phân cắt bằng Bam HI và Xho I bằng

cách sử dụng T4 ADN ligaza (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất để tạo ra plasmit pP24HNK. Việc tách dòng của gen P24HNK thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam* HI-*Xho* I dẫn đến sự dịch mã gen P24HNK của *Magnaporthe oryzae* dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu kép NA2-tpi. NA2-tpi là đoạn khởi đầu được cải biến từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger*, trong đó trình tự dẫn không được dịch mã đã được thay thế bằng trình tự dẫn không được dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphat isomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Plasmit đã nối pP24HNK được biến nạp vào tế bào *E. coli* cạnh tranh hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất và được chuyển lên các đĩa LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm, các khuẩn lạc được thấy là sinh trưởng chọn lọc trên các đĩa LB ampixilin. Hai khuẩn lạc được biến nạp bằng cấu trúc P24HNK GH16 được nuôi cấy trong môi trường LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml và plasmit được phân lập bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất.

Plasmit đã phân lập được giải trình tự sử dụng các đoạn môi vectơ và các đoạn môi đặc hiệu gen P24HNK để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmit điển hình mà không có sai số.

Phân tích đặc tính của trình tự ADN bổ trợ của *Magnaporthe oryzae* mã hóa Polypeptit P24HNK GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Việc giải trình tự ADN của dòng vô tính ADN bổ trợ P24HNK GH16 của *Magnaporthe oryzae* được thực hiện bằng máy đọc trình tự ADN tự động Applied Biosystems Model 3700 sử dụng phiên bản 3.1 BIG-DYE™ terminator chemistry (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Mỹ) và phương pháp di chuyển đoạn môi. Dữ liệu về trình tự nucleotit được nghiên cứu kỹ về chất lượng và tất cả các trình tự được so sánh với nhau nhờ sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, Mỹ).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P24HNK của *Magnaporthe oryzae* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4. Trình tự mã hóa gồm 777 cặp bazơ bao gồm codon kết thúc. Protein dự đoán được mã hóa là 258 axit amin. Bằng cách sử dụng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997,

Protein Engineering 10: 1-6), peptit tín hiệu có 25 gốc được dự đoán. Protein trưởng thành được dự đoán chứa 233 axit amin có phân tử lượng được dự đoán là 26kDa và độ pH đẳng điện là 4,9.

Sự biểu hiện của endo- β -1,3-galactanaza GH16 của *Magnaporthe oryzae* GALAC-TANAZA2

Plasmit biểu hiện pP24HNK được biến nạp vào MT3568 của *Aspergillus oryzae*. MT3568 của *Aspergillus oryzae* là dẫn xuất đã phá vỡ AMDS (axetamidaza) của JaL355 (WO 02/40694), trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động pyrG được khôi phục trong quá trình bất hoạt gen axetamidaza (AMDS) của *Aspergillus oryzae*. Các thể nguyên sinh MT3568 được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong patent Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp vào đây để tham khảo.

Các thể biến nạp được tinh chế trên đĩa chọn lọc sucroza COVE thông qua hạt dính duy nhất trước khi tạo bào tử chúng trên các đĩa PDA. Việc sản xuất polypeptit GH16 của *Magnaporthe oryzae* bằng các thể biến nạp được phân tích từ các phần dịch nổi nuôi cấy của môi trường nuôi cấy tĩnh có 96 lỗ sâu 1ml ở nhiệt độ 30°C trong YP+môi trường glucoza 2%. Việc biểu hiện được xác nhận trên gel 48 lỗ E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) bằng cách nhuộm Coomassie. Một thể biến nạp được chọn để nghiên cứu thêm và được ký hiệu là *Aspergillus oryzae* 100.3.

Để sản xuất trên quy mô lớn, các bào tử *Aspergillus oryzae* 100.3 được dàn lên trên đĩa PDA và ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C. Đĩa bào tử hợp dòng được rửa hai lần bằng 5ml TWEEN® 20 0,01% để tối đa hóa số lượng các bào tử được gom. Hỗn dịch chứa bào tử sau đó được sử dụng để cấy truyền mười lăm bình dung tích 500ml chứa 150ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc không đổi là 100 vòng/phút. Vào ngày thứ tư sau khi cấy truyền, môi trường nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua máy lọc bottle top MF75 Supor MachV 0,2 μ m PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Môi trường nuôi cấy mới từ thể biến nạp này tạo ra dải protein GH16 khoảng 26kDa. Độ tương đồng của dải như polypeptit GH16 của *Magnaporthe oryzae* được xác nhận bằng cách giải trình tự peptit.

Tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Magnaporthe oryzae* (GALACTANAZA2)

Môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch của *Magnaporthe oryzae* được bổ sung amoni sulphat 1,5M đến nồng độ cuối cùng là 1,5M và độ pH được điều chỉnh đến 7. Sau đó, mẫu này được nạp lên cột kỵ nước (tầng được đóng gói chứa viên butyl Toyo; gradien: 0-100% B trong 10 thể tích cột; dung dịch đệm A: Mes 50mM và amoni sulphat 1,5M; dung dịch đệm B: Mes 50mM). SDS-PAGE (các điều kiện khử) xác nhận rằng galactanaza không được rửa giải qua cột trong phân đoạn chảy qua hoặc phân đoạn rửa. Dựa trên SDS-PAGE, các phân đoạn chứa protein có Mw được mong đợi là 28,5kDa (phân đoạn 33 - 46) được gộp lại, được cô và được trao đổi dung dịch đệm thành dung dịch đệm natri axetat 20mM có độ pH = 6,5 bằng cách ly tâm trong màng MWCO cột xoay viva 3kDa (ly tâm xoay ở tốc độ 30000 m/s²).

Ví dụ 3. Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Neurospora crassa* (GALACTANAZA3)

Chiết ADN của hệ gen FGSC987 chủng *Neurospora crassa*

Để tạo ra ADN hệ gen để khuếch đại PCR, FGSC987 chủng *Neurospora crassa* (ATCC 24698, LGC Standards AB, Borås, Thụy Điển) được nhân giống trên các đĩa thạch PDA bằng cách cho sinh trưởng ở nhiệt độ 26°C trong thời gian 7 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa PDA được sử dụng để cấy truyền 25ml YP+môi trường glucoza 2% trong bình lắc có vách ngăn và được ủ ở nhiệt độ 26°C trong thời gian 72 giờ có khuấy ở tốc độ là 85 vòng/phút.

ADN hệ gen được phân lập theo phương pháp chuẩn của bộ kit được cải biến DNeasy Plant Maxi (Qiagen Denmark, Copenhagen, Đan Mạch). Nguyên liệu nấm từ môi trường nuôi cấy nêu trên được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 140000 m/s² trong thời gian 2 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và 0,5g viên nhỏ được làm đông lạnh trong nitơ lỏng với cát thạch anh và được nghiền thành bột mịn trong cối giã được làm lạnh trước. Bột này được chuyển vào ống ly tâm 15ml và bổ sung 5ml dung dịch đệm AP1 (được làm nóng sơ bộ đến nhiệt độ 65°C) và 10 μ l dung dịch gốc RNaza A (100mg/ml), sau đó là khuấy mạnh. Sau khi ủ trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 65°C với sự chuyển hóa bình thường của ống, 1,8ml dung dịch đệm AP2 được bổ sung vào dịch thủy phân bằng cách trộn nhẹ, sau đó là ủ trên đá trong thời gian 10 phút. Dịch thủy phân này sau đó được ly tâm ở tốc độ 30000 m/s² trong thời gian 5 phút ở

nhiệt độ trong phòng và phần dịch nổi trên bề mặt được gạn vào cột xoay QIAshredder maxi được đặt trong ống gom 50ml. Sau bước này là bước ly tâm ở tốc độ 30000 m/s² trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dòng chảy qua được chuyển vào ống 50ml mới và bổ sung 1,5 thể tích dung dịch đệm AP3/E, sau đó là khuấy. 15ml mẫu này được chuyển vào cột xoay DNeasy Maxi được đặt trong ống gom dung tích 50ml và ly tâm ở tốc độ 30000 m/s² trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dòng chảy qua được loại bỏ và 12ml dung dịch đệm AW được bổ sung vào cột xoay DNeasy Maxi được đặt trong ống gom dung tích 50ml và ly tâm ở tốc độ 30000 m/s² trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ dòng chảy qua, lặp lại việc ly tâm để loại bỏ rượu còn lại. Cột xoay DNeasy Maxi được chuyển vào ống 50ml mới và 0,5ml dung dịch đệm AE (được làm nóng sơ bộ đến 70°C) được bổ sung vào. Sau khi ủ trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, mẫu này được rửa giải bằng cách ly tâm ở tốc độ 30000 m/s² trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Lặp lại việc rửa giải bằng 0,5ml dung dịch đệm AE bổ sung và các chất rửa giải được kết hợp. Nồng độ của ADN đã thu hoạch được đo bằng phổ quang kế UV ở 260nm.

Xây dựng cấu trúc vectơ biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự hệ gen *Neurospora crassa* chủng FGSC987 mã hóa polypeptit họ GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Dựa trên trình tự hệ gen của Swissprot entry Q7RZX8 được chú thích là protein được dự đoán của GH16 có nguồn gốc từ trình tự hệ gen *Neurospora crassa* (Broad Institute, Cambridge, MA, Mỹ), hai đoạn mỗi oligonucleotit tổng hợp được thể hiện dưới đây được thiết kế để khuếch đại PCR gen FGSC987 P24HN2 giống *Neurospora crassa* từ ADN hệ gen được chuẩn bị trên đây. Bộ kit tách dòng IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, Mỹ) được sử dụng để tách dòng mảnh này trực tiếp vào vectơ biểu hiện pDau109 (WO 2005/042735).

F-P24HN2 (SEQ ID NO: 5)

5'-ACACAACTGGGGGATCCACCATGAGGAGGTCCTTCCAACAACCC -3'

R-P24HN2 (SEQ ID NO: 6)

5'-CCCTCTAGATCTCGAGTGGACATCTTGAAGGGACAACTCCT -3'

Các chữ cái in đậm là trình tự gen. Trình tự được gạch chân là đồng nhất với các vị trí xen vào của pDau109.

Dụng cụ MJ Research PTC-200 DNA được sử dụng để tiến hành phản ứng PCR. Bộ kit Phusion® High-Fidelity PCR (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) được sử dụng để khuếch đại PCR. Phản ứng PCR bao gồm 10µl 5X dung dịch đệm HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finland), 1µl dNTPs (10mM), 0,5µl Phusion® ADN polymeaza (2 đơn vị/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Finland), 2µl đoạn mồi F-P24HN2 (2,5µM), 2µl đoạn mồi R-P24HN2 (2,5µM), 2µl ADN hệ gen của *Neurospora crassa* (100ng/µl), và 32,5µl nước được khử ion trong tổng thể tích là 50µl. Các điều kiện PCR là 1 chu kỳ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 2 phút. 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ ở nhiệt độ 98°C trong 10 giây, nhiệt độ 60°C trong 30 giây, và nhiệt độ 72°C trong thời gian 2 phút; và 1 chu kỳ ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút. Mẫu này sau đó được giữ ở nhiệt độ 12°C cho đến khi được loại bỏ khỏi máy PCR.

Các sản phẩm phản ứng được phân lập bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng bazơ Tris 40mM, natri axetat 20mM, dung dịch đệm dinatri EDTA 1mM (TAE), trong đó dải sản phẩm gồm 1077 cặp bazơ được cắt ra từ gel và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế dải gel và ADN illustra GFX® PCR (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Mảnh này sau đó được tách dòng thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam* HI và *Xho* I bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng IN-FUSION™ để tạo ra plasmit pP24HN2. Việc tách dòng gen P24HN2 thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam* HI-*Xho* I dẫn đến sự phiên mã gen P24HN2 của *Neurospora crassa* dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu kép NA2-tpi. NA2-tpi là đoạn khởi đầu được cải biến từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger*, trong đó trình tự dẫn không được dịch mã đã được thay thế bằng trình tự dẫn không được dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphat isomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Phương pháp tách dòng được thực hiện theo các chỉ dẫn của bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra cấu trúc P24HN2 GH16. Plasmit đã xử lý và quá trình xen vào được biến nạp vào tế bào *E. coli* cạnh tranh hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất và được chuyển lên các đĩa LB đã được bổ sung 0,1mg ampicilin cho mỗi ml. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C qua

đêm, các khuẩn lạc được thấy là sinh trưởng chọn lọc trên các đĩa LB ampicilin. Hai khuẩn lạc được biến nạp với cấu trúc P24HN2 GH16 được nuôi cấy trong môi trường LB đã được bổ sung 0,1mg ampicilin cho mỗi ml và plasmit được phân lập bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất.

Plasmit đã phân lập được giải trình tự sử dụng các đoạn môi vectơ và các đoạn môi đặc hiệu gen P24HN2 để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmit điển hình mà không có sai số PCR.

Phân tích đặc tính của trình tự hệ gen FGSC987 của *Neurospora crassa* mã hóa polypeptit GH16 có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza

Việc giải trình tự ADN của dòng vô tính hệ gen FGSC987 P24HN2 GH16 của *Neurospora crassa* được thực hiện với máy đọc trình tự ADN tự động Applied Biosystems Model 3700 sử dụng phiên bản 3.1 BIG-DYE™ terminator chemistry (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Mỹ) và phương pháp di chuyển đoạn môi. Dữ liệu về trình tự nucleotit được nghiên cứu kỹ về chất lượng và tất cả các trình tự được so sánh với nhau nhờ sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, Mỹ).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P24HN2 của *Neurospora crassa* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Trình tự mã hóa gồm 1025 cặp bazơ bao gồm codon kết thúc và được làm gián đoạn bởi hai intron. Protein dự đoán được mã hóa gồm 265 axit amin. Bằng cách sử dụng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu có 27 gốc được dự đoán. Protein trưởng thành được dự đoán chứa 238 axit amin với phân tử lượng được dự đoán là 26kDa và độ pH đẳng điện là 9,3.

Sự sắp xếp toàn cầu từng cặp so sánh của các trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) với điểm phạt mở khoảng trống bằng 10, điểm phạt kéo dài khoảng trống bằng 0,5, và ma trận EBLOSUM62. Việc sắp xếp này chỉ ra rằng, trình tự axit amin suy ra của gen *Neurospora crassa* mã hóa polypeptit P24HN2 GH16 có hoạt tính endo-beta-1,3-galactanaza chiếm 97% độ tương đồng (loại trừ khoảng trống)

so với trình tự axit amin suy ra của protein họ GH16 giả định không được biệt hóa *Neurospora tetrasperma* (số truy cập SWISSPROT: F8MMR0).

Sự biểu hiện của endo- β -1,3-galactanaza GH16 của *Neurospora crassa* GALACTANAZA3

Plasmid biểu hiện pP24HN2 được biến nạp vào MT3568 của *Aspergillus oryzae*. MT3568 của *Aspergillus oryzae* là dẫn xuất đã phá vỡ AMDS (axetamidaza) của JaL355 (WO 02/40694), trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động pyrG được khôi phục trong quá trình bất hoạt gen axetamidaza (AMDS) của *Aspergillus oryzae*. Các thể nguyên sinh MT3568 được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong patent Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp vào đây để tham khảo.

Các thể biến nạp được tinh chế trên đĩa chọn lọc sucroza COVE qua hạt dính duy nhất trước khi tạo bào tử chúng trên các đĩa PDA. Sự sản sinh polypeptit GH16 của *Neurospora crassa* bởi các thể biến nạp được phân tích từ các phân dịch nổi nuôi cấy của môi trường nuôi cấy tĩnh có 96 lỗ sâu 1ml ở nhiệt độ 30°C trong YP+môi trường glucoza 2%. Việc biểu hiện được xác nhận trên gel 48 lỗ E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) bằng cách nhuộm Coomassie. Một thể biến nạp được chọn để nghiên cứu thêm và được ký hiệu là *Aspergillus oryzae* 90.1.

Để sản xuất trên quy mô lớn, các bào tử 90.1 *Aspergillus oryzae* được dàn lên trên đĩa PDA và ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C. Đĩa bào tử hợp dòng được rửa hai lần bằng 5ml TWEEN® 20 0,01% để tối đa hóa số lượng các bào tử được gom. Hỗn dịch chứa bào tử sau đó được sử dụng để cấy truyền mười lần bình dung tích 500ml chứa 150ml môi trường Dap-4C. Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc không đổi là 100 vòng/phút. Vào ngày thứ tư sau khi cấy truyền, môi trường nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua máy lọc bottle top MF75 Supor MachV 0,2 μ m PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Môi trường nuôi cấy mới từ thể biến nạp này tạo ra dải protein GH16 khoảng 26kDa. Độ tương đồng của dải nổi bật như polypeptit GH16 của *Neurospora crassa* được xác nhận bằng cách giải trình tự peptit.

Phương pháp thay thế để sản xuất endo- β -1,3-galactanaza GH16 của *Neurospora crassa* GALACTANAZA3

Dựa trên trình tự nucleotit được nhận biết là SEQ ID NO: 7, gen tổng hợp có thể thu được từ một số 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, Mỹ). Gen tổng hợp này có thể được thiết kế để kết hợp các trình tự ADN bổ sung như các vị trí giới hạn hoặc các vùng tái tổ hợp đồng nhất để hỗ trợ việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Bằng cách sử dụng hai đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp F-P24HN2 và F-P24HN2 nêu trên, phản ứng PCR đơn giản có thể được sử dụng để khuếch đại khung đọc mở có độ dài đầy đủ từ gen của SEQ ID NO: 7. Gen này sau đó có thể được tách dòng vào vector biểu hiện, ví dụ, như nêu trên và được biểu hiện trong tế bào chủ, ví dụ, trong *Aspergillus oryzae* như nêu trên.

Tinh chế endo- β -1,3-galactanaza của *Neurospora crassa* (GALACTANAZA3)

Môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch của *Neurospora crassa* được bổ sung amoni sulphat 1,5M đến nồng độ cuối cùng là 1,5M và độ pH được điều chỉnh đến 8. Sau đó, mẫu này được nạp lên cột kỵ nước (tàng được đóng gói chứa viên butyl Toyo; gradien: 0-100% B trong 10 thể tích cột; dung dịch đệm A: Mes 50mM và amoni sulphat 1,5M; dung dịch đệm B: Mes 50mM). SDS-PAGE (các điều kiện khử) xác nhận rằng galactanaza không được rửa giải qua cột trong phân đoạn chảy qua hoặc phân đoạn rửa. Dựa trên SDS-PAGE, các phân đoạn chứa protein có Mw được mong đợi bằng 28,9kDa (phân đoạn 34 - 48) được gộp lại, được cô và được trao đổi dung dịch đệm thành dung dịch đệm natri axetat 20mM có độ pH = 6,5 bằng cách ly tâm trong màng MWCO cột xoay vivaspin 3kDa (ly tâm xoay ở tốc độ 30000 m/s²).

Ví dụ 4. Tách dòng, biểu hiện và tinh chế exo- β -1,3-galactanaza GH43 của *Irpex lacteus* (GALACTANAZA4)

Xây dựng cấu trúc vector biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự ADN bổ trợ chủng *Irpex lacteus* mã hóa polypeptit họ GH43 có hoạt tính exo- β -1,3-galactanaza

Dựa trên trình tự nucleotit EMBL:AB461394, gen tổng hợp P24QQC (SEQ ID NO: 9) thu được từ GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) mã hóa ADN bổ trợ của

exo-beta-1,3-galactanaza của *Irpex lacteus* với vị trí giới hạn bổ sung BamHI và XhoI để hỗ trợ việc tách dòng vào vector biểu hiện.

Cấu trúc GeneArt chứa P24QQC được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI và XhoI và các sản phẩm phản ứng được phân lập bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng bazơ Tris 40mM, natri axetat 20mM, dung dịch đệm dinatri EDTA 1mM (TAE), trong đó dải sản phẩm gồm 1360 cặp bazơ được cắt ra từ gel và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế dải gel và ADN illustra GFX® PCR (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phân đoạn này sau đó được tách dòng thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam* HI và *Xho* I bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng IN-FUSION™ để thu được plasmit pP24QQC. Việc tách dòng gen P24QQC thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam* HI-*Xho* I dẫn đến sự dịch mã gen P24QQC của *Irpex lacteus* dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu kép NA2-tpi. NA2-tpi là đoạn khởi đầu được cải biến từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính của *Aspergillus niger*, trong đó trình tự dẫn không được dịch mã đã được thay thế bằng trình tự dẫn không được dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphat isomeraza của *Aspergillus nidulans*.

Phương pháp tách dòng được thực hiện theo các chỉ dẫn của bộ kit tách dòng IN-FUSION™ tạo ra cấu trúc P24QQC GH43. Plasmit đã xử lý và quá trình xen vào được biến nạp vào tế bào *E. coli* cạnh tranh hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất và được chuyển lên các đĩa LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm, các khuẩn lạc được thấy là sinh trưởng trong điều kiện chọn lọc trên các đĩa LB ampixilin. Hai khuẩn lạc được biến nạp với cấu trúc P24QQC GH43 được nuôi cấy trong môi trường LB đã được bổ sung 0,1mg ampixilin cho mỗi ml và plasmit được phân lập bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất.

Plasmit đã phân lập được giải trình tự sử dụng các đoạn môi vectơ và các đoạn môi đặc hiệu gen P24QQC để xác định dòng vô tính biểu hiện plasmit điển hình mà không có sai số PCR.

Phân tích đặc tính của trình tự ADN bổ trợ *Irpex lacteus* mã hóa polypeptit GH43 có hoạt tính $\text{exo-}\beta\text{-1,3-galactanaza}$

Việc giải trình tự ADN của dòng vô tính ADN bổ trợ P24QQC GH43 của *Irpex lacteus* được thực hiện bằng máy đọc trình tự ADN tự động Applied Biosystems Model 3700 sử dụng phiên bản 3.1 BIG-DYE™ terminator chemistry (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Mỹ) và phương pháp di chuyển đoạn môi. Dữ liệu về trình tự nucleotit được nghiên cứu kỹ về chất lượng và tất cả các trình tự được so sánh với nhau nhờ sự hỗ trợ của phần mềm PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, Mỹ).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen P24QQC của *Irpex lacteus* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10. Trình tự mã hóa gồm 1347 cặp bazơ bao gồm codon kết thúc. Protein dự đoán được mã hóa gồm 448 axit amin. Bằng cách sử dụng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu có 20 gốc được dự đoán. Protein trưởng thành được dự đoán chứa 428 axit amin với phân tử lượng được dự đoán là 46kDa và độ pH đẳng điện bằng 6,1. Các axit amin ở vị trí 337 đến vị trí 448 là CBM35 giả định.

Sự biểu hiện của $\text{exo-}\beta\text{-1,3-galactanaza}$ GH43 của *Irpex lacteus* (GALACTANAZA4)

Plasmit biểu hiện pP24QQC được biến nạp vào MT3568 của *Aspergillus oryzae*. MT3568 của *Aspergillus oryzae* là dẫn xuất đã phá vỡ AMDS (axetamidaza) của JaL355 (WO 02/40694), trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động pyrG được khôi phục trong quá trình bất hoạt gen axetamidaza (AMDS) của *Aspergillus oryzae*. Các thể nguyên sinh MT3568 được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong patent Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp vào đây để tham khảo.

Các thể biến nạp được tinh chế trên các đĩa chọn lọc sucroza COVE qua hạt dính duy nhất trước khi tạo bào tử chúng trên các đĩa PDA. Sự sản sinh polypeptit GH43 của *Irpex lacteus* bởi các thể biến nạp được phân tích từ phần dịch nổi nuôi cấy của môi trường nuôi cấy tĩnh có 96 lỗ sâu 1ml ở nhiệt độ 30°C trong YP+môi trường glucoza 2%. Việc biểu hiện được xác nhận trên gel 48 lỗ E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) bằng cách nhuộm Coomassie. Một thể biến nạp được chọn để nghiên cứu thêm và được ký hiệu là *Aspergillus oryzae* 433.1.

Để sản xuất trên quy mô lớn, các bào tử *Aspergillus oryzae* 433.1 được dàn lên trên đĩa PDA và ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C. Đĩa bào tử hợp đồng được rửa hai lần bằng 5ml TWEEN® 20 0,01% để tối đa hóa số lượng các bào tử được gom. Hỗn dịch chứa bào tử sau đó được sử dụng để cấy truyền mười lăm bình dung tích 500ml chứa 150ml môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc không đổi là 100 vòng/phút. Vào ngày thứ tư sau khi cấy truyền, môi trường nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua máy lọc bottle top MF75 Supor MachV 0,2µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Môi trường nuôi cấy mới từ thể biến nạp này tạo ra dải protein GH43 khoảng 46kDa. Độ tương đồng của dải như polypeptit GH43 của *Irpex lacteus* được xác nhận bằng cách giải trình tự peptit.

Tinh chế exo-β-1,3-galactanaza GH43 của *Irpex lacteus*

Môi trường đã lọc được điều chỉnh đến độ pH bằng 7,5 và được lọc trên bộ lọc PES 0,22µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware cat#595-4520). Sau đó, dịch lọc được bổ sung amoni sulphat 1,8M. Dịch lọc này được nạp lên trên cột chảy nhanh 6 Phenyl Sepharose™ (thay thế mức độ cao) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng với amoni sulphat 1,8M, HEPES 25mM có độ pH = 7,5. Sau khi rửa bằng amoni sulphat 1,0M, các protein liên kết được rửa giải theo mẻ với HEPES 25mM có độ pH = 7,5. Các phân đoạn được gom và được phân tích bằng SDS-PAGE. Các phân đoạn này được gộp lại và áp dụng vào cột Sephadex™ G-25 (môi trường) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng trong HEPES 25mM có độ pH = 7,5. Các phân đoạn này được áp dụng vào cột SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng trong HEPES 25mM có độ pH = 7,5 và các protein liên kết được rửa giải bằng gradien tuyến tính từ natri clorua 0-1000 mM trên 20CV. Protein này không liên kết với cột, và chất rửa giải được cô bằng cách sử dụng phương pháp siêu lọc trên bộ lọc 30000 MWCO PES Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Đức), và chất cô được phân tích bằng SDS-PAGE.

Ví dụ 5: Tách dòng, biểu hiện và tinh chế endo- β -1,4-galactanaza GH53 của *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GALACTANAZA)

Xây dựng cấu trúc vectơ biểu hiện *Aspergillus oryzae* chứa trình tự ADN *Ignisphaera aggregans* mã hóa polypeptit họ GH53 có hoạt tính endo- β -1,4-galactanaza

Dựa trên trình tự nucleotit UNIPROT:E0SSW8, gen được tối ưu hóa codon để biểu hiện *A. oryzae* mã hóa endo- β -1,4-galactanaza được cắt bỏ đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 11) được tạo ra dựa trên thuật toán tương tự được phát triển bởi Gustafsson et al, 2004*. Gen tổng hợp (SEQ ID NO: 11) bao phủ nucleotit 1 đến 1221 của trình tự nucleotit UNIPROT:E0SSW8 thu được từ GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) mã hóa ADN của endo- β -1,4-galactanaza được cắt bỏ đầu tận cùng C của *Ignisphaera aggregans* với vị trí giới hạn BamHI môi 5', vị trí giới hạn HindIII codon kết thúc môi 3', và trình tự liên ứng Kozac (CACC) được bố trí giữa codon khởi đầu và vị trí giới hạn BamHI.

Cấu trúc GeneArt chứa gen endo- β -1,4-galactanaza tổng hợp được xử lý bằng các enzym giới hạn BamHI và HindIII và các sản phẩm phản ứng được phân lập bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng bazo Tris 40mM, natri axetat 20mM, dung dịch đệm dinatri EDTA 1mM (TAE), trong đó dải sản phẩm 1239 cặp bazơ được cắt ra từ gel và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế dải gel và ADN illustra GFX® PCR (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Đan Mạch) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Mảnh gồm 1239 cặp bazơ sau đó được tách dòng thành pDau109 (WO 2005/042735) được phân cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (New England Biolabs, Ipswich, MA, Mỹ). pDau109 được phân cắt bằng *Bam*HI-*Hind*III và phân đoạn *Bam*HI/*Hind*III chứa trình tự mã hóa endo- β -1,4-galactanaza được trộn theo tỷ lệ mol là 1:3 (tức là, tỷ lệ khối lượng khoảng 2,5:1 hoặc 20ng:50ng) và được nối với 50U T4 ADN ligaza trong dung dịch đệm 1X T4 ADN ligaza (New England Biolabs, Ipswich, MA, Mỹ) với ATP 1mM ở nhiệt độ 16°C qua đêm theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Việc tách dòng gen endo- β -1,4-galactanaza tổng hợp thành pDau109 được phân cắt bằng *Bam*HI-*Hind*III dẫn đến sự dịch mã gen endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans* dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu kép NA2-tpi. NA2-tpi là đoạn khởi đầu được cải biến từ gen mã hóa alpha-amylaza trung tính *Aspergillus niger*,

trong đó trình tự dẫn không được dịch mã đã được thay thế bằng trình tự dẫn không được dịch mã từ gen mã hóa trioza phosphat isomeraza *Aspergillus nidulans*.

Plasmid đã xử lý và quá trình xen vào được biến nạp vào tế bào *E. coli* cạnh tranh hóa học One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất và được chuyển lên các đĩa LB đã được bổ sung 0,1mg ampicilin cho mỗi ml. Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C, các khuẩn lạc được thấy sinh trưởng trong môi trường chọn lọc trên các đĩa LB ampicilin.

Việc xen gen endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans* vào pDau109 được xác nhận bằng PCR trên các khuẩn lạc như được mô tả dưới đây bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau.

Đoạn mồi F-pDau109 (SEQ ID NO: 13):

5'-CCCTTGTCGATGCGATGTATC-3'

Đoạn mồi R-pDau109 (SEQ ID NO: 14):

5'-ATCCTCAATTCCGTCGGTCGA-3'

Hỗn hợp nước cái 1.1X REDDYMIX® (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch) được sử dụng để khuếch đại PCR. Phản ứng PCR gồm có 10 μ l hỗn hợp nước cái 1.1X REDDYMIX®, 0,5 μ l đoạn mồi F-pDau109 (10 μ M), và 0,5 μ l đoạn mồi R-pDau109 (10 μ M). Sử dụng tăm để chuyển một lượng nhỏ các tế bào vào dung dịch PCR. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng dụng cụ PTC-200 DNA được lập trình 1 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 2 phút 30 giây; 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 15 giây, nhiệt độ 60°C trong 30 giây, và nhiệt độ 68°C trong 1 phút 30 giây; và 1 chu kỳ ở nhiệt độ 68°C trong 7 phút. Mẫu này sau đó được giữ ở nhiệt độ 10°C cho đến khi được loại bỏ khỏi máy PCR.

Các sản phẩm phản ứng PCR được phân tích bằng phương pháp điện di gel agarosa 1,0% bằng cách sử dụng dung dịch đệm TAE, trong đó dải sản phẩm PCR 1541 cặp bazơ được quan sát xác nhận sự xen trình tự mã hóa endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans* vào pDau109.

Thế biến nạp *E. coli* chứa cấu trúc endo- β -1,4-galactanaza GH53 của *Ignisphaera aggregans* được nuôi cấy trong môi trường LB đã bổ sung 0,1mg ampicilin cho mỗi ml và plasmid được phân lập bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN

Inc., Valencia, CA, Mỹ) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất. Plasmid này được ký hiệu pBETA-1,4-GALACTANAZA.

Phân tích đặc tính của trình tự ADN mã hóa polypeptit GH53 endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans*

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin suy ra của gen endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. Trình tự mã hóa gồm 1224 cặp bazơ bao gồm codon kết thúc. Protein dự đoán được mã hóa gồm 407 axit amin. Bằng cách sử dụng chương trình SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), peptit tín hiệu có 26 gốc được dự đoán. Protein trưởng thành được dự đoán chứa 381 axit amin với phân tử lượng được dự đoán là 43kDa và độ pH đẳng điện là 4,8.

Sự biểu hiện của endo- β -1,4-galactanaza GH53 của *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GALACTANAZA)

Plasmid biểu hiện được biến nạp vào MT3568 *Aspergillus oryzae*. MT3568 *Aspergillus oryzae* là dẫn xuất đã phá vỡ AMDS (axetamidaza) của JaL355 (WO 02/40694), trong đó hiện tượng dinh dưỡng thụ động pyrG được khôi phục trong quá trình bất hoạt gen axetamidaza (AMDS) *Aspergillus oryzae*. Các thể nguyên sinh MT3568 được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong patent Châu Âu số 0238023, trang 14-15, mà được kết hợp vào đây để tham khảo.

Các thể biến nạp được tinh chế trên các đĩa chọn lọc sucroza COVE qua hạt dính duy nhất trước khi tạo bào tử chúng trên các đĩa PDA. Sự sản sinh polypeptit GH53 của *Ignisphaera aggregans* bởi các thể biến nạp được phân tích từ phần dịch nổi nuôi cấy của môi trường nuôi cấy tĩnh có 96 lỗ sâu 1ml ở nhiệt độ 30°C trong YP+môi trường glucoza 2%. Việc biểu hiện được xác nhận trên gel 48 lỗ E-Page 8% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) bằng cách nhuộm Coomassie. Một thể biến nạp được chọn để nghiên cứu thêm và được ký hiệu là KHJN0032-3.

Để sản xuất trên quy mô lớn, các bào tử KHJN0032-3 được dàn lên trên đĩa PDA và ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C. Đĩa bào tử hợp đồng được rửa hai lần bằng 5ml TWEEN® 20 0,01% để tối đa hóa số lượng các bào tử được gom. Hỗn dịch chứa bào tử sau đó được sử dụng để cấy truyền mười lăm bình dung tích 500ml chứa 150ml

môi trường Dap-4C (WO 2012/103350). Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc không đổi là 100 vòng/phút. Ở ngày thứ năm sau khi cấy, môi trường nuôi cấy được gom bằng cách lọc qua máy lọc bottle top MF75 Supor Mach V 0,2µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Đan Mạch). Môi trường nuôi cấy mới từ thể biến nạp này tạo ra dải protein GH43 khoảng 43kDa.

Tinh chế endo-β-1,4-galactanaza GH53 của *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GA-LACTANAZA)

Môi trường đã lọc được điều chỉnh đến độ pH bằng 7,0 và lọc trên bộ lọc PES 0,22µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware cat#595-4520). Sau đó, dịch lọc được bổ sung amoni sulphat 1,0M. Dịch lọc được nạp lên trên cột chảy nhanh 6 Phenyl Sepharose™ (thay thế mức độ cao) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng với amoni sulphat 1,0M, HEPES 25mM có độ pH = 7,0. Các protein liên kết được rửa giải theo mẻ với HEPES 25mM có độ pH = 7,0, sau đó là EtOH 50%. Các phân đoạn được gom và phân tích bằng SDS-PAGE. Các phân đoạn này được gộp lại và áp dụng vào cột Sephadex™ G-25 (môi trường) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng trong HEPES 25mM có độ pH = 7,0. Các phân đoạn này được áp dụng vào cột SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Mỹ) được cân bằng trong HEPES 25mM có độ pH = 7,0 và các protein liên kết được rửa giải bằng gradien tuyến tính từ natri clorua 0-500mM. Các phân đoạn được gom và phân tích bằng SDS-PAGE.

Ví dụ 6. Tổng hợp cơ chất β-1,3-galactan

Các hydrat cacbon khác nhau được sử dụng để làm cơ chất để đặc trưng hóa β-1,3-galactanaza:

a) Gôm arabic

Có thể mua được trên thị trường (Merck). Phức hợp polysacarit gồm có D-galactoza (44%); L-arabinoza (24%); axit D-glucuronic (14,5%); L-rhamnoza (13%); axit 4-O-metyl-D-glucuronic (1,5%). β-1,3 liên kết galactoza tạo ra mạch chính.

b) Gôm arabic được xử lý bằng axit

Gôm Arabic được xử lý bằng TFA 0,1M trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 90°C. Phản ứng được dừng bằng cách điều chỉnh độ pH đến 7 bằng NaOH 4M. Mẫu này sau đó được khử bằng NaBH₄ (2mg trong mỗi mg polysacarit) trong thời gian 3 giờ ở nhiệt

độ trong phòng, sau đó là thẩm tách qua đêm. Chất rắn được thu hồi bằng cách làm đông khô. TLC xác nhận sự giảm arabinoza trong polysacarit.

c) Gôm arabic phân rã Smith

Gôm Arabic được làm phân rã theo phương pháp phân rã Smith được mô tả trong tài liệu (Tsumuraya et al., Carbohydrate Research, 1984, 134, 215-228). Chuỗi bên gôm arabic (arabinoza và galactoza liên kết ở β -1,6) trước tiên được phân tách bằng periodat (lượng dư được phá hủy bằng etylen glycol), sau đó được khử bằng natri borohydrua, và thủy phân bằng axit loãng trong các điều kiện nhẹ nhàng. Phương pháp này được lặp lại 3 lần. NMR xác nhận sự giảm arabinoza và galactoza liên kết ở β -1,6 từ các chuỗi bên. Quá trình oxy hóa gôm arabic (lên đến 5g) với natri metaperiodat 50mM (lên đến 500mL) được tiến hành trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trong thời gian từ 48 đến 96 giờ. Phản ứng này được kết thúc bằng cách bổ sung etylen glycol (lên đến 4mL) và khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thẩm tách qua đêm (3,5kDa MWCO, nước cất), quá trình khử sản phẩm đã oxy hóa được thực hiện bằng NaBH_4 (2mg trong mỗi mg polysacarit) trong thời gian 3 giờ. Phản ứng này được kết thúc bằng cách tạo độ pH = 7 bằng AcOH 10% và thẩm tách qua đêm. Sau khi làm bay hơi xuống thể tích nhỏ, mẫu được thủy phân bằng TFA đã pha loãng (0,5M) trong các điều kiện nhẹ nhàng trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi làm bay hơi hầu hết axit và điều chỉnh độ pH đến 7 bằng cách bổ sung NaOH 1M, cơ chất được kết tủa bằng 3 thể tích etanol và thu hồi bằng cách ly tâm và làm đông khô. Phương pháp này được lặp lại 3 lần để tạo ra 3 loại gôm arabic phân rã Smith.

Ví dụ 7: Thử nghiệm đường khử (thử nghiệm PAH-BAH) để định lượng hoạt tính β -1,3-galactanaza

Hoạt tính β -1,3-galactanaza được xác định trong hai bước. Bước thứ nhất là bước enzym hóa, trong đó cơ chất hydrat cacbon được thủy phân bằng tác động xúc tác của galactanaza. Bước thứ hai là bước phát hiện không enzym hóa, trong đó nhóm aldehyt của mono- và oligosacarit được khử để tạo ra hợp chất được nhuộm màu vàng.

a) Thử nghiệm hoạt tính – sự phân rã của polysacarit

- 50 μ L dung dịch enzym 0,08g/L (nước MilliQ dùng cho mẫu trống) được trộn với 50 μ L dung dịch đệm hoạt tính (dung dịch đệm natri axetat 20mM có độ pH

= 5) và 50 μ L dung dịch cơ chất (5-10 g/L được hòa tan trong nước MilliQ) trong PCR-MTP có 96 lỗ

- Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 45 phút trong máy PCR
- Phản ứng được dừng bằng cách làm tăng nhiệt độ đến 95°C trong thời gian 10 phút

b) Thử nghiệm hoạt tính – phát hiện các đường khử (PAHBAH – thử nghiệm)

- 25 μ L mẫu ở trên được pha loãng với 100 μ L NaOH 1M trong PCR-MTP có 96 lỗ mới
- 75 μ L dung dịch dừng mới được bổ sung vào lỗ (hydrazit của axit 4-hydroxy benzoic được hòa tan trong 15g/L trong NaOH 2% (khối lượng/thể tích) và K-Na-tartrat 5% (khối lượng/thể tích))
- Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 70°C
- Mức độ hấp thụ điểm cuối được đo ở bước sóng 405nm

Tính toán hoạt tính:

Đường cong tiêu chuẩn đối với các đường khử được tạo ra có các nồng độ galactose khác nhau nằm trong khoảng từ 0,05g/L đến 3 g/L theo phương pháp trên. Thu được đẳng thức tiêu chuẩn sau: lượng đường được giải phóng (đo được theo μ g đương lượng galactose): $m_{\text{đương lượng galactose}} = (A_{405} - 0,0061)/0,016$. Mức độ hấp thụ quan sát được của mẫu trống luôn được lấy mức độ hấp thụ thu được trừ đi cho phép so sánh tất cả các kết quả. Lượng đường khử được giải phóng sau phản ứng (45 phút ở nhiệt độ 40°C) được tính theo đường cong tiêu chuẩn. Hoạt tính enzym (%) được tính dưới dạng phần trăm của các đương lượng galactose được giải phóng so với tổng khối lượng cơ chất polysacarit (Bảng 1).

Ví dụ: Đối với thử nghiệm với 5g/L gôm arabic phân rã Smith, tổng lượng polysacarit là 250 μ g. Sau phản ứng hai bước, mức độ hấp thụ của mẫu là 2,26 với mức độ hấp thụ của mẫu trống là 0,16 tương ứng với 131 μ g đương lượng galactose cho hoạt tính quan sát được là 52%.

Bảng 1. Hoạt tính tương đối (% đương lượng cuối khử galactose được giải phóng trên mỗi khối lượng cơ chất) để làm phân rã gôm arabic và các sản phẩm liên quan

Enzym	Gôm Arabic phân rã Smith	Gôm arabic được xử lý bằng axit	Gôm Arabic
GALACTANAZA1	52,7	9,2	2,6
GALACTANAZA2	43,6	0,5	0,2
GALACTANAZA3	46,2	9,3	2,7
GALACTANAZA4	25,6	17,7	2,4

Sự giảm chuỗi bên trên cơ chất làm tăng hoạt tính galactanaza.

Ví dụ 8: Thử nghiệm TLC để phát hiện hoạt tính β -1,3-galactanaza

Hỗn hợp phản ứng đã bất hoạt bằng nhiệt (Ví dụ 7a) được phân tích bằng TLC (Silica gel 60 F254) để đặc trưng hóa enzym về hoạt tính endo và hoạt tính exo. Chất rửa giải là butan-1-ol, etanol và nước (5/5/4 thể tích/thể tích). Các hợp chất đối chiếu là arabinosa ($R_{fara} = 0,56$); galactosa ($R_{fGal} = 0,53$); β -1,4-galactobioza ($R_{fGal2} = 0,50$) và β -1,6-galactotetraoza ($R_{fGal4} = 0,44$). Sản phẩm phản ứng mong muốn β -1,3-galactobioza được mong đợi di chuyển với R_f tương tự như β -1,4-galactobioza, và β -1,3-galactotetraoza được cho là di chuyển với R_f tương tự như β -1,6-galactotetraoza. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Hoạt tính tương đối (% đương lượng cuối cùng khử galactosa được giải phóng trên mỗi khối lượng cơ chất) và thành phần sản phẩm để làm phân rã β -1,3-Galactan (gôm arabic phân rã gấp ba lần Smith) bằng 4 galactanaza

Enzym	Gôm arabic được phân rã Smith			
	GALAC-TANAZA1	GALAC-TANAZA2	GALAC-TANAZA3	GALAC-TANAZA4
% hoạt tính	52,7	43,6	46,2	25,6
Arabinosa	-	-	-	-
Galactosa	++	++	++	+++

Galactobioza	+++	+++	+++	+
Galactotetraoza	++	++	++	-

Sự giải phóng arabinoza, galactozo, galactobioza và galactotetraoza được phát hiện bằng TLC. (-) có nghĩa là không có đốm nào trên đĩa, và (+), (++) , (+++) cho biết đốm có các cường độ khác nhau (+ càng nhiều, thì càng nhiều đốm). Thành phần sản phẩm chủ yếu chứng minh hoạt tính nội sinh của GALACTANAZA1, GALACTANAZA2 và GALACTANAZA3 và hoạt tính ngoại sinh của GALACTANAZA4.

Ví dụ 9: Độ pH tối ưu và độ ổn định pH của galactanaza

Độ ổn định pH của GALACTANAZA1 và GALACTANAZA4 (0,08g/L) được đánh giá bằng cách xác định hoạt tính enzym bằng thử nghiệm đường khử (Ví dụ 7) sau khi ủ với dung dịch cơ chất (2,5g/L gồm arabic phân rã Smith hoặc 15g/L gồm arabic được xử lý bằng axit) trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ 40°C ở các giá trị pH được chọn nằm trong khoảng từ 1,5 đến 10. Hoạt tính của các galactanaza được thử nghiệm ngay sau khi điều chỉnh độ pH (t₀), hoặc sau khi ủ enzym ở độ pH cho trước trong thời gian 24 giờ trong tủ lạnh trước khi bổ sung cơ chất (24 giờ) (Bảng 3 và 4). Độ pH được đo trước và sau phản ứng để xác nhận rằng độ pH là không đổi trong quá trình ủ.

Bảng 3: Thành phần đệm có hoạt tính, độ pH được điều chỉnh theo độ pH mong muốn

pH	Dung dịch đệm được sử dụng
1,5; 2; 2,5	KCl/HCl 60mM
3; 3,6; 3,9; 4,3; 4,7; 5; 5,2; 5,7	natri axetat 20mM
6	Mes 50mM
7 và 8	HEPES 50mM
9 và 10	Tris HCl 50mM

Bảng 4: Hoạt tính quan sát được (%) ở các giá trị pH khác nhau

Hoạt tính GALACTANAZA1				Hoạt tính GALACTANAZA4		
Cơ chất	Gôm arabic phân rã Smith		Gôm arabic được xử lý bằng axit	Gôm arabic phân rã Smith		Gôm arabic được xử lý bằng axit
pH	t0	24 giờ	t0	t0	24 giờ	t0
1,5	0,9	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
2	27,4	1,5	2,3	1,6	0,6	1,8
2,5	40,2	31,4	2,6	6,1	2,0	8,8
3	42,5	32,9	6,8	13,6	8,3	17,1
3,6	42,6	27,2	10,0	19,1	8,5	18,3
3,9	44,5	37,6	10,2	19,2	9,4	18,0
4,3	40,9	45,1	9,7	19,5	9,4	17,2
4,6	43,6	43,0	9,5	18,8	8,0	16,4
5,1	45,7	38,4	8,3	19,3	8,3	13,9
5,7	40,8	36,9	7,5	16,6	8,6	9,1
6	39,4	40,7	6,8	15,2	8,2	8,6
7	36,3	39,8	3,3	9,5	4,5	2,1
8	19,1	20,9	0,2	0,5	0,1	0,0
9	2,6	2,3	0,0	0,8	0,2	0,0
10	0,0	0,5	0,0	0,4	0,1	0,0

Ví dụ 10: Độ ổn định nhiệt của galactanaza được đánh giá bằng DSC

Độ ổn định nhiệt của GALACTANAZA1, GALACTANAZA2, GALACTANAZA3 và GALACTANAZA4 được đánh giá bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai Differential Scanning Calorimetry (DSC) trong dung dịch đệm thích hợp (natri axetat 20mM có độ pH = 6,5). Nhiệt độ tương ứng với đỉnh của đỉnh trong biểu đồ nhiệt như được ghi lại làm điểm trung bình chuyển tiếp nhiệt (T_m (°C)) đối với enzym.

Bảng 5: Nhiệt độ điểm trung bình

Enzym	Nhiệt độ °C
GALACTANAZA1	66,2
GALACTANAZA2	58,0
GALACTANAZA3	62,3
GALACTANAZA4	43,1

Ví dụ 11: Độ ổn định nhiệt của galactanaza được đánh giá bằng thử nghiệm đường khử ở các nhiệt độ khác nhau

Độ ổn định nhiệt của GALACTANAZA1 và GALACTANAZA4 (0,04 g/L) được đánh giá bằng cách xác định hoạt tính enzym bằng thử nghiệm đường khử (Ví dụ 7) sau khi ủ với 2,5g/L dung dịch cơ chất (Gôm arabic phân rã Smith) trong thời gian 45 phút ở độ pH = 5 ở các nhiệt độ đã chọn nằm trong khoảng từ 20°C đến 90°C. Enzym được bổ sung vào thử nghiệm sau khi mẫu (dung dịch đệm và dung dịch cơ chất) được làm nóng đến nhiệt độ đã chọn. Nhiệt độ tối ưu là 60°C (GALACTANAZA1) và 30°C (GALACTANAZA4) được quan sát (Bảng 6).

Bảng 6: Hoạt tính quan sát được (%) ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính GALACTANAZA1	Hoạt tính GALACTANAZA4
20	44,1	19,9

30	42,9	20,2
40	41,5	20,2
50	38,0	18,5
60	50,1	16,6
70	44,8	13,4
80	47,9	4,5
90	17,3	0,3

Ví dụ 12: Xử lý sơ bộ nguyên liệu cà phê

800mL nước sôi được bổ sung vào 155g hạt cà phê Arabica đã rang và xay với cỡ hạt là 0,5mm. Sau khi ủ trong bể nước ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 30 phút bằng cách trộn bằng tay mỗi 5 phút, huyền phù đặc được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Sau khi lọc chân không ban đầu qua bộ lọc Whatman GF/D, Ø 150mm, cà phê đã qua sử dụng không hòa tan trên bộ lọc được rửa bằng cách bổ sung 500 - 1000 mL nước MilliQ. Cà phê đã qua sử dụng được loại bỏ khỏi bộ lọc và dàn ra trên tấm lớn và để khô qua đêm. Phần chiết này được gọi là bã cà phê và được sử dụng trong Ví dụ 14.

Bã cà phê đã qua sử dụng còn được tách béo bằng butanol bão hòa trong nước. Phân đoạn butanol này được tách bằng cách lọc và bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo được làm khô trong điều kiện chân không trước khi sử dụng. Bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo này được sử dụng trong Ví dụ 13.

Ví dụ 13: Quá trình thủy phân được xúc tác bằng enzym của bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo

a) Chất chiết enzym

Bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo đã tạo ra theo Ví dụ 12 (10% khối lượng) được ủ với nước và enzym đã pha loãng thích hợp (để thu được nồng độ phản ứng cuối cùng là 0,05g/L đối với galactanaza và 0,2% thể tích đối với Mannaway®

25L ở nhiệt độ 40°C (đối với GALACTANAZA1-4) hoặc ở nhiệt độ 80°C (đối với BETA-1,4-GALACTANAZA). Các mẫu được rút ra sau 2 và 24 giờ và quá trình thủy phân bằng enzym được dừng ngay lập tức bằng cách làm nóng các mẫu ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút. Sau khi ly tâm (ở tốc độ 100000m/s², 10 phút) và lọc qua bộ lọc 0,22µm, các phần dịch nổi trên bề mặt còn được phân tích thêm về chất khô, thành phần hydrat cacbon và mức độ hấp thụ. Các phương pháp được thực hiện 2 lần đối với tất cả các enzym và mẫu trống (không có enzym).

b) Xác định chất khô

Hàm lượng chất khô (DM) được định lượng sau khi làm khô phần dịch nổi trên bề mặt qua đêm ở nhiệt độ 110°C từ bã cà phê đã qua sử dụng được xử lý enzym. Khối lượng của chất khô được chia bởi thể tích phần dịch nổi trên bề mặt bổ sung và giá trị DM dựa trên g/L được tính. Các đặc tính của chất chiết dựa trên DM được nêu tóm tắt trong Bảng 7. Tác dụng hiệp đồng được tính bằng cách bổ sung DM của các lần xử lý enzym riêng rẽ (xử lý β -1,3-galactanaza và mananaza) và trừ đi một mẫu trống, sau đó là chia giá trị đã quan sát được cho giá trị theo lý thuyết.

Bảng 7: Chất khô của chất chiết bã đã sử dụng được tách béo sau các lần xử lý enzym khác nhau.

Xử lý enzym	Chất khô (g/L)		Tác dụng hiệp đồng (%)	
	2 giờ	24 giờ	2 giờ	24 giờ
Không có enzym	1,5	2,4	-	-
Mannaway	3,0	7,0	-	-
GALACTANAZA1	9,2	13,8	-	-
GALACTANAZA2	3,6	7,2	-	-
GALACTANAZA3	5,4	8,3	-	-
GALACTANAZA4	5,2	7,7	-	-

Mannaway + GALACTANAZA1	14,5	25,5	136	139
Mannaway + GALACTANAZA2	7,9	15,9	154	135
Mannaway + GALACTANAZA3	10,6	18,3	153	142
Mannaway + GALACTANAZA4	9,6	16,5	144	134

Hiệu suất thu các chất rắn hòa tan về cơ bản lớn hơn khi Mannaway được ủ cùng với enzym bất kỳ trong số các enzym β -1,3-galactanaza, so với khi các enzym được ủ một mình. Với cơ chất này và trong các điều kiện nghiên cứu, tác dụng hiệp đồng thay đổi nằm trong khoảng từ 134 đến 154 %.

Trong cùng một thiết lập cài đặt nhưng ở nhiệt độ cao hơn (80°C), BETA-1,4-GALACTANAZA được ủ với bã đã sử dụng được tách béo (Bảng 8). Tuy nhiên, việc bổ sung loại galactanaza này không có tác dụng đáng kể bất kỳ ở các tình trạng và liều lượng enzym được áp dụng trong nghiên cứu này.

Bảng 8: Chất khô của chất chiết bã đã qua sử dụng được tách béo sau khi xử lý bằng endo- β -1,4-galactanaza của *Ignisphaera aggregans*

Xử lý enzym	Chất khô (g/L)	
	2 giờ	24 giờ
Không có enzym	1,5	4,1
BETA-1,4-GALACTANAZA	2,4	3,8

c) Phân tích hydrat cacbon

Thành phần đường được phân tích bằng cách đo monosacarit tự do trong các phần dịch nổi trên bề mặt bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao bằng phương pháp phát hiện ampe kế xung (HPAEC-PAD). Tổng lượng đường được phân tích bằng HPAEC-PAD sau khi thủy phân axit trong axit triflo axetic 2M trong 2 giờ ở nhiệt độ 95°C. Các mẫu được thủy phân axit được trung hòa bằng cách pha loãng ban

đầu trong NaOH 0,2M. Monosacarit được định lượng sau khi pha loãng thích hợp dựa trên đường cong tiêu chuẩn 5 điểm của arabinosa (Ara), galactosa (Gal), glucoza (Glc) và mannoza (Man) nằm trong khoảng từ 0,002 đến 0,02 g/L. Các kết quả có thể được thấy trong Bảng 9 và 10.

Bảng 9: Monosacarit tự do trong chất chiết từ bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo sau khi xử lý enzym.

Xử lý enzym	Monosacarit tự do/DM (%)			
	2 giờ		24 giờ	
	Gal	Man	Gal	Man
Không có enzym	0	0	0	0
Mannaway	0	1	0	1
GALACTANAZA1	4	0	6	0
GALACTANAZA2	1	0	2	0
GALACTANAZA3	1	0	1	0
GALACTANAZA4	18	0	16	0
Mannaway + GALACTANAZA1	2	0	3	1
Mannaway + GALACTANAZA2	1	1	1	1
Mannaway + GALACTANAZA3	1	0	1	1
Mannaway + GALACTANAZA4	9	1	8	1

Chất chiết từ quá trình xử lý bằng các enzym tác động nội sinh (Mannaway và GALACTANAZA1, GALACTANAZA2, GALACTANAZA3) chứa một lượng tương đối thấp monosacarit, trái ngược với việc xử lý bằng galactanaza tác động ngoại sinh (GALACTANAZA4).

Bảng 10: Tổng thành phần đường trong chất chiết từ bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo sau khi xử lý enzym. Monosacarit trong phần dịch nổi trên bề mặt sau khi thủy phân axit.

Xử lý enzym	Tổng monosacarit/DM (%)							
	2 giờ				24 giờ			
	Ara	Gal	Glc	Man	Ara	Gal	Glc	Man
Không có enzym	0	13	0	26	8	8	8	25
Mannaway	0	7	7	46	3	9	3	46
GALACTANAZA1	13	72	0	4	10	55	1	6
GALACTANAZA2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	44	3	11
GALACTANAZA3	11	55	0	7	10	48	2	7
GALACTANAZA4	8	54	4	8	10	52	3	8
Mannaway +GALACTANAZA1	8	40	1	30	7	35	1	38
Mannaway +GALACTANAZA2	8	33	3	30	6	28	1	33
Mannaway +GALACTANAZA3	8	36	2	30	7	31	1	36
Mannaway +GALACTANAZA4	6	35	2	31	6	29	1	30

n.d. Không được xác định

Sự chênh lệch giữa galactosa tự do và tổng galactosa là hàm lượng của galactooligosacarit trong chất chiết và tương tự đối với monosacarit còn lại.

Bảng 11: Tỷ lệ phần trăm sacarit có mặt dưới dạng monosacarit tính theo khối lượng của tổng lượng đường dưới dạng monosacarit.

Xử lý enzym	Monosacarit tự do/Tổng lượng đường (%)	
	2 giờ	24 giờ
Không có enzym	0	1
Mannaway	2	2
GALACTANAZA1	5	8
GALACTANAZA2	n.d.	2
GALACTANAZA3	1	2
GALACTANAZA4	24	23
Mannaway + GALACTANAZA1	3	5
Mannaway + GALACTANAZA2	2	3
Mannaway + GALACTANAZA3	1	2
Mannaway + GALACTANAZA4	13	13

n.d. Không được xác định

d) Độ hấp thụ

Độ hấp thụ ở bước sóng 361nm của các mẫu được đo sau các lần pha loãng thích hợp các phần dịch nổi trên bề mặt và kiểm hóa bằng ít nhất bằng độ pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong Na_2CO_3 0,2M. Chia độ hấp thụ cho DM (g/L) đã cho phép đo chất lượng liên quan đến màu được giải phóng bằng DM (Bảng 12). Galactanaza giải phóng nhiều màu hơn trên mỗi DM so với Mannaway cho thấy giải phóng các hợp chất có hương vị tốt hơn so với xử lý Mannaway. Điều này có thể là do các hợp chất này bị bắt giữ trong ma trận galactan hoặc do sự có mặt của chúng trong các phức chất melanoidin được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt bằng beta-1,3-galactanaza. Sự khác biệt về mức độ giải phóng màu sắc bởi các phương pháp xử lý enzym khác nhau cũng có

thể nhìn thấy một cách rõ ràng trong các chất chiết cà phê, có thể dễ dàng được phát hiện bằng mắt thường.

Bảng 12: Chất lượng chất chiết. Mức độ hấp thụ của chất chiết sau khi kiểm hóa ở bước sóng 361nm trong mỗi chất khô.

Xử lý enzym	Mức độ hấp thụ ($A_{361} \cdot L/g$) dịch nổi trên bề mặt			Màu trong phần
	2 giờ	24 giờ	24 giờ	
Mannaway	0,64	0,50		+
GALACTANAZA1	0,77	0,89		+++
GALACTANAZA2	1,05	0,92		++
GALACTANAZA3	0,92	0,77		++
GALACTANAZA4	0,85	0,90		++
Mannaway + GALACTANAZA1	0,70	0,71		+++
Mannaway + GALACTANAZA2	0,72	0,72		+++
Mannaway + GALACTANAZA3	0,77	0,78		+++
Mannaway + GALACTANAZA4	0,68	0,87		+++

d) Phân bố theo phân tử lượng

Sự phân bố theo phân tử lượng của các chất chiết riêng rẽ được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký loại trừ kích cỡ bằng máy dò chỉ số khúc xạ. Chất chiết có phân tử lượng trung bình cao hơn sẽ tạo độ nhớt và cảm giác ngon miệng hơn so với chất chiết có phân tử lượng trung bình thấp hơn. Do đó, thông số này được sử dụng để làm thông số chất lượng (Bảng 13). Các khối lượng được xác định bằng cách sử dụng tiêu chuẩn pullulan 342-210000 Da cũng như maltotriosa, maltopentaoza và maltoheptaoza.

Bảng 13: Sự phân bố theo phân tử lượng của chất chiết cà phê. Tỷ lệ phần trăm dựa vào diện tích dưới đường cong trong các khoảng phân tử lượng tương ứng. DP là mức độ polyme hóa, tức là, >DP5 nghĩa là phân đoạn oligosacarit có mức độ polyme hóa cao hơn 5. Tất cả các chất chiết enzym có phân tử lượng đỉnh thấp hơn 10kDa.

Xử lý enzym	2 giờ			24 giờ		
	>DP 5	DP3- DP5	DP1- DP3	>DP 5	DP3- DP5	DP1- DP3
Không có enzym*	0%	0%	0%	88%	5%	7%
Mannaway	29%	52%	19%	51%	21%	27%
GALACTANAZA1	84%	7%	9%	80%	8%	12%
GALACTANAZA2	85%	7%	8%	84%	7%	9%
GALACTANAZA3	90%	5%	5%	88%	6%	6%
GALACTANAZA4	58%	14%	28%	60%	13%	27%
Mannaway+GALAC- TANAZA1	70%	14%	16%	63%	18%	19%
Mannaway+GALAC- TANAZA2	66%	15%	19%	63%	18%	19%
Mannaway+GALAC- TANAZA3	73%	12%	15%	67%	16%	17%
Mannaway+GALAC- TANAZA4	52%	18%	30%	52%	20%	28%

* Theo lý thuyết, không có thêm chất chiết nào có thể hòa tan được từ bã cà phê đã qua sử dụng được tách béo mà không có enzym. Đây là phân quan sát được sau 2 giờ, nhưng sau 24 giờ, một số đường vẫn được giải phóng ra

Ví dụ 14. Quá trình thủy phân được xúc tác bằng enzym của bã cà phê đã qua sử dụng

Bã cà phê đã qua sử dụng được tạo ra theo Ví dụ 12 ở nồng độ cuối cùng là 10% khối lượng chất khô trong nước được ủ với Mannaway 25L hoặc β -1,3-galactanaza (GALACTANAZA1) ở nồng độ cuối cùng là 0,2% thể tích đối với Mannaway 25L và

0,05g/L đối với GALACTANAZA1, trong thời gian 2 và 24 giờ. Phản ứng enzym được tiến hành ở nhiệt độ 40°C với bằng cách trộn cố định và được bất hoạt ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 10 phút.

Chất khô, thành phần hydrat cacbon, mức độ hấp thụ ở bước sóng 361nm và sự phân bố theo phân tử lượng của các chất chiết riêng rẽ được xác định theo Ví dụ 13. Các đặc tính của chất chiết được nêu tóm tắt trong Bảng 14-17.

Bảng 14: Thành phần hydrat cacbon của chất chiết được xử lý bằng enzym của bã cà phê đã qua sử dụng. Monosacarit tự do và tổng monosacarit được đo sau khi thủy phân axit (tổng lượng đường).

	Monosacarit tự do (g/L)		Tổng lượng đường (g/L)			
	Gal	Man	Ara	Gal	Glc	Man
2 giờ						
Không có enzym	0	0	0,1	0,2	0	0,4
Mannaway	0	0,03	0,1	0,2	0	0,6
GALACTANAZA1	0,35	0	0,9	5,3	0	0,6
Mannaway +GALACTANAZA1	0,36	0,65	1,2	6,3	0,1	7,9
24 giờ						
Không có enzym	0	0	0,1	0,2	0	0,5
Mannaway	0	0,16	0,1	0,4	0,1	1,8
GALACTANAZA1	0,74	0	1,4	7,8	0,1	0,9
Mannaway +GALACTANAZA1	0,77	2,08	2	9,4	0,1	17

Bảng 15: Các đặc tính của chất chiết. Tổng lượng đường được tính bằng khối lượng của chúng sau khi thủy phân axit. Nồng độ bã đã sử dụng ban đầu là 100g/L.

	DM (g/L)	Tổng lượng đường /DM (%)	Monosaca- rit tự do /DM (%)	Monosacarit tự do /tổng lượng đường (%)
2 giờ				
Không có enzym	2,60	27	0,0	0,0
Mannaway	3,26	28	0,9	3,3
GALACTANAZA1	9,68	70	3,6	5,1
Mannaway + GALAC- TANAZA1	19,8 ^a	78	5,1	6,5
24 giờ				
Không có enzym	3,94	20	0,0	0,0
Mannaway	7,23	33	2,2	6,7
GALACTANAZA1	13,4	76	5,5	7,3
Mannaway + GALAC- TANAZA1	34,7 ^b	82	8,2	10,0

^{a,b} tác dụng hiệp đồng của việc kết hợp Mannaway với Galactanaza1 là 190% sau 2 giờ và 200% sau 24 giờ.

Bảng 16: Chất lượng của chất chiết. Mức độ hấp thụ của chất chiết sau khi kiềm hóa ở nồng độ 361nm trong mỗi chất khô.

Xử lý enzym	Abs ₃₆₁ /DM (A ₃₆₁ *L/g)	
	2 giờ	24 giờ
Mannaway	0,91	0,93
GALACTANAZA1	1,06	1,45
Mannaway +GALACTANAZA1	1,63	1,21

Bảng 17: Sự phân bố kích cỡ của các chất chiết cà phê. Tỷ lệ phần trăm dựa trên diện tích dưới đường cong trong các khoảng phân tử lượng tương ứng. Tất cả các chất chiết enzym có phân tử lượng đỉnh thấp hơn 10kDa.

Xử lý enzym	2 giờ			24 giờ		
	>DP5	DP3- DP5	DP1- DP3	>DP5	DP3- DP5	DP1- DP3
Không có en- zym	85%	5%	11%	88%	7%	5%
Mannaway	52%	15%	33%	43%	20%	38%
GALAC- TANAZA1	86%	7%	7%	82%	8%	10%
Mannaway +GALAC- TANAZA1	60%	16%	23%	45%	16%	39%

Ví dụ 15. Các đặc tính của cà phê làm từ các hạt đã rang xay và cà phê hòa tan

Cà phê được chuẩn bị từ các hạt “Mokka Blanding” mới xay (Stellini Kaffe, Odense Đan Mạch). Cà phê hòa tan được pha bằng cách hòa tan 4g bột cà phê hòa tan (Nescafe® Gold Blend®, golden roast) trong 150mL nước sôi. Các mẫu cà phê đã trộn được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 100000 m/s² ở nhiệt độ 10°C và được lọc qua bộ lọc 0,22µm trước khi phân tích thêm. Chất khô, thành phần sacarit và độ hấp thụ ở bước sóng 361nm được đo theo Ví dụ 13.

Bảng 18: Monosacarit tự do và tổng thành phần đường của các mẫu cà phê.

	Ara	Gal	Glc	Man	Tổng cộng
Cà phê	(g/L)				
Monosacarit tự do	0,01	0	0	0	0,01
Tổng lượng đường	0,3	0,6	0,2	0,7	1,8
Cà phê hòa tan					
Monosacarit tự do	0,18	0,14	0,03	0,2	0,55
Tổng lượng đường	1	4,8	0,2	5,2	11,2

Bảng 19: Các đặc tính của mẫu cà phê. Tổng lượng đường được tính bằng khối lượng của chúng sau khi thủy phân axit.

	Monosacarit tự do			
	Tổng lượng đường	Monosacarit tự do	/Tổng lượng đường (%)	
	DM (g/L)	/DM (%)	/DM (%)	
Cà phê	9	20,0	0,1	0,6

Cà phê hòa tan	25	44,8	2,2	4,9
----------------	----	------	-----	-----

Bảng 20: chất lượng chất chiết. Mức độ hấp thụ của chất chiết sau khi kiềm hóa ở bước sóng 361nm và trong mỗi chất khô

	Abs ₃₆₁	Abs ₃₆₁ /DM (Abs ₃₆₁ *L/g)
Cà phê	61	6,7
Cà phê hòa tan	99	3,9

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

- a. chuẩn bị hạt cà phê rang và xay;
- b. thêm nước và enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza vào các hạt cà phê này;
- c. ủ để tạo ra chất chiết cà phê chứa nước; và
- d. tách riêng chất chiết cà phê khỏi các hạt cà phê đã chiết;

trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza này là enzym thủy phân đặc hiệu beta-1,3-galactan và beta-1,3-galactooligosacarit; và

trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza này chủ yếu có hoạt tính endo- β -1,3-galactanaza.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước b. còn bao gồm việc bổ sung enzym có hoạt tính mananaza.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza và enzym có hoạt tính mananaza tác dụng theo cách hiệp đồng để làm tăng lượng các chất rắn tan trong cà phê.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,5 g enzym protein/kg hạt cà phê.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là chế phẩm enzym, khác biệt ở chỗ, ít nhất 5% tổng protein là enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza làm hoạt tính enzym chiếm ưu thế của nó.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza là β -1,3-galactanaza của họ GH16.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym có hoạt tính β -1,3-galactanaza có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 60% so với trình tự trưởng thành của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 8.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt cà phê rang và xay đã được chiết một phần.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất chiết cà phê chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong cà phê, trong đó tổng lượng galactosa có nghĩa là galactosa tự do đã được hòa tan cộng với galactosa liên kết trong oligosacarit đã được hòa tan.

10. Chất chiết cà phê thu được theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất chiết này:

- a. chứa ít nhất 20% tổng galactosa tính theo tổng khối lượng các chất rắn tan trong hạt cà phê;
- b. có hàm lượng galactosa tự do nhỏ hơn 15% khối lượng của tổng hàm lượng galactosa;
- c. có tỷ lệ khối lượng giữa tổng galactosa với tổng arabinoza lớn hơn 3:1; và
- d. khác biệt ở chỗ, ít nhất 45% khối lượng phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 5;

trong đó tổng galactosa có nghĩa là galactosa tự do đã được hòa tan cộng với galactosa liên kết trong oligosacarit đã được hòa tan; và

trong đó tổng arabinoza có nghĩa là arabinoza tự do đã được hòa tan cộng với arabinoza liên kết trong oligosacarit đã được hòa tan.

11. Chất chiết cà phê theo điểm 10, trong đó chất chiết này còn khác biệt ở chỗ, ít nhất 15% khối lượng phân đoạn hydrat cacbon của nó là oligosacarit có mức độ polyme hóa nhỏ hơn 55.

12. Chất chiết cà phê theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 11, trong đó chất chiết này chứa arabinogalactan oligosacarit có mức độ polyme hóa lớn hơn 2 và thấp hơn 55 với lượng ít nhất bằng 15% tính theo tổng khối lượng của chất rắn tan trong hạt cà phê.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Novozymes A/S	
<120>	Phương pháp sản xuất chất chiết cà phê và chất chiết cà phê	
<130>	12671-WO-PCT	
<160>	15	
<170>	PatentIn phiên bản 3.5	
<210>	1	
<211>	771	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Gen tổng hợp	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1)..(768)	
<400>	1	
	atg att tcc gtc gct ttg gtc cca ctc ttc atc gct gtg ctt gcc agc	48
	Met Ile Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Phe Ile Ala Val Leu Ala Ser	
	1 5 10 15	
	gcg acg tcg agc gtc gtc ctc ccg acg aac tcg ttc agc tcg tac agc	96
	Ala Thr Ser Ser Val Val Leu Pro Thr Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Ser	
	20 25 30	
	gcc ttt gag cag cac tgg aac tac ctc tac cct tgg ggc tcg gac cac	144
	Ala Phe Glu Gln His Trp Asn Tyr Leu Tyr Pro Trp Gly Ser Asp His	
	35 40 45	
	aac ggc tcc ggg cgc atg gtg ggc agc tcg tcg aac cac acg tac atc	92
	Asn Gly Ser Gly Arg Met Val Gly Ser Ser Ser Asn His Thr Tyr Ile	
	50 55 60	
	agc gtc gcg gac aac gtt ctc acg ctc acc tcg aag ccc gtc tcc ggg	240
	Ser Val Ala Asp Asn Val Leu Thr Leu Thr Ser Lys Pro Val Ser Gly	
	65 70 75 80	
	cag cct ccg agc acc tcc aac ccg cac ccg gcc atc cat tac ttc tct	288
	Gln Pro Pro Ser Thr Ser Asn Pro His Pro Ala Ile His Tyr Phe Ser	
	85 90 95	
	ggc act gtc cat gcg aag caa cag gtc aag gtc gac gga agt agc gtc	336
	Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val	
	100 105 110	

acg ggg ttc gac atc cag gga gag ttc att gct ccg act gca aaa ggc 84
 Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly
 115 120 125

acg tgg cct gcg ttc tgg ctt act gcg gtg aat gga tgg cct ccg gag 432
 Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu
 130 135 140

agc gac att ggt gaa tgg aag ggc acc cag gaa aac tgg ttc aat acc 80
 Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr
 145 150 155 160

ttc aac act tcc tca tca gtc gcg acg aag cgc gtc gcc tgg ccc acg 528
 Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr
 165 170 175

gac ggc cag ttc cat tcc ctg aag gcc gag ctg cgc acg atc tcg ggc 76
 Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly
 180 185 190

aac acg aag gac ctc tcg atc aag tac tac ttc gac gga acg ctg cag 624
 Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln
 195 200 205

gcg act cac acg gca gct aac ttc cgc aac gcc gct atg tgg ttg att 672
 Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile
 210 215 220

gtc gac ctt cag atg gag gga agc tcg ggc tct ccg ggc cca gct ggc 20
 Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly
 225 230 235 240

ggc acg acg ttc caa atc agg aac gtc cag ttg acg aag tat acg ccg 768
 Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro
 245 250 255

tga 771

<210> 2
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Met Ile Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Phe Ile Ala Val Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Thr Ser Ser Val Val Leu Pro Thr Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Ser
 20 25 30

Ala Phe Glu Gln His Trp Asn Tyr Leu Tyr Pro Trp Gly Ser Asp His
 35 40 45

Asn Gly Ser Gly Arg Met Val Gly Ser Ser Ser Asn His Thr Tyr Ile
 50 55 60

Ser Val Ala Asp Asn Val Leu Thr Leu Thr Ser Lys Pro Val Ser Gly
 65 70 75 80
 Gln Pro Pro Ser Thr Ser Asn Pro His Pro Ala Ile His Tyr Phe Ser
 85 90 95
 Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val
 100 105 110
 Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly
 115 120 125
 Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu
 130 135 140
 Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr
 145 150 155 160
 Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr
 165 170 175
 Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly
 180 185 190
 Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln
 195 200 205
 Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile
 210 215 220
 Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro
 245 250 255
 <210> 3
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Gen tổng hợp
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(774)
 <400> 3
 atg ttt aat tct ata ccc cat ttc ctg cta atg acc tct ggg gtc gga 48
 Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
 1 5 10 15
 att gcg ttg atg cca caa gtg atg gca gtc agg acc atg ata cca tgc 96
 Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
 20 25 30
 acc agc ttc gac aac cag tcc aac ttc gac gca gac tgg aat tac aac 144
 Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
 35 40 45

tac ccc tgg gga acc gac cac aac ggc gcc gcg cgt atg gat ggt gcc	192
Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala	
50 55 60	
aac gcg gtc cgg ttg gcg agc aga ggt gac cgt aca ctt gtc att act	240
Asn Ala Val Arg Leu Ala Ser Arg Gly Asp Arg Thr Leu Val Ile Thr	
65 70 75 80	
gca cgc cgt gcc gaa ggc ctg ccg cct gcc act cac gga ggc cag cag	288
Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln	
85 90 95	
att cct atc agg tat ctg tct ggg gcc atc cac gcc aaa gaa cag ttt	336
Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe	
100 105 110	
act gtc cgg cca aac ggc ggc tac gat ttc aca gga gag ttc aaa gcc	384
Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala	
115 120 125	
aca aca acc aag ggt acc tgg cca gcc ttc tgg ctc aca gga gtg gac	432
Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp	
130 135 140	
agt tgg cca ccg gag att gac atg gca gaa tgg aaa ggt agc ggg aaa	480
Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
atc agc ttc aac acg ttc aac acg tcg agc gaa gtc gtg tcg cga gac	528
Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp	
165 170 175	
gtg gat tac cct gcg cct gac cag ttc cat agc atc aag tgc gaa gtg	576
Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val	
180 185 190	
aga gac gaa ggg cag gat gtc cgc gcc aat ttc tat atg gat ggc aac	624
Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn	
195 200 205	
ctg ctt acc act cag atc gga aaa gga tac gtc ggg aaa cca ctc ttc	672
Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe	
210 215 220	
ttg att atc aac ttg cag atg gag gga tct tcg ggc acc ccg ggc ccc	720
Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro	
225 230 235 240	
gag tca gat acc gaa tac gcc ata cga aac ctg gag gtt ctt tcc tat	768
Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr	
245 250 255	
aac ccg tga	777
Asn Pro	
<210> 4	
<211> 258	
<212> PRT	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
 1 5 10 15

Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
 20 25 30

Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
 35 40 45

Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala
 50 55 60

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

Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln
 85 90 95

Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe
 100 105 110

Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala
 115 120 125

Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp
 130 135 140

Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp
 165 170 175

Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val
 180 185 190

Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn
 195 200 205

Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe
 210 215 220

Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro
 225 230 235 240

Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr
 245 250 255

Asn Pro
 <210> 5
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 5
acacaactgg ggatccacca tgaggaggtc cttccaacaa ccc

43

<210> 6
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 6
ccctctagat ctcgagtgga catcttgaag ggacaactcc t

41

<210> 7
<211> 1061
<212> ADN
<213> Neurospora crassa

<220>
<221> exon
<222> (1)..(710)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(710)

<220>
<221> Intron
<222> (711)..(840)

<220>
<221> exon
<222> (841)..(893)

<220>
<221> CDS
<222> (841)..(893)

<220>
<221> Intron
<222> (894)..(990)

<220>
<221> exon
<222> (991)..(1025)

<220>
<221> CDS
<222> (991)..(1022)

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1026)..(1061)

<400> 7
atg agg agg tcc ttc caa caa ccc ctt ccc ctt ctc ctc caa acc atc
Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
1 5 10 15

48

acc atc ctc tgc ctc ttc cca tct acc ctc gcc tca tcc aag acc ctc	96
Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu	
20 25 30	
cta atc cct tcc aca tcc ttc aac tcc acc acc acc ttc aac acc tac	144
Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr	
35 40 45	
tgg tcc ttc aat tac ccc tgg ggc acc gac cac aat ggc gcc gcg cgc	192
Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg	
50 55 60	
atg tcc cct tcc caa gtc tcc ata gcc ccc tct gct gac ggc acc tca	240
Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser	
65 70 75 80	
agc acc ctc act cta acc gcc cac cgc gtc acc ggc caa aaa ccc gct	288
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala	
85 90 95	
acc cac ggc ggc aaa cag atc ccc atc aag tac cta tcc ggc gcc atc	336
Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile	
100 105 110	
cac gcc aag cag cac ttc acc att act tct tct tct tct ggt gct ggt	384
His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly	
115 120 125	
gca gtg tca ggc tac gat ttc tca gcc gag ttc cgc gcc ccc gtt gcg	432
Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala	
130 135 140	
aag ggg acc tgg cct gcg ttt tgg ttg acg gcc gtc aat ggg tgg ccg	480
Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro	
145 150 155 160	
ccc gag att gat atg gcg gag tgg aag ggg agc ggc aag att agc ttt	528
Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys Ile Ser Phe	
165 170 175	
aac acg ttc aat act agt agt cag gtc atg gct cgg gat gtg gtt tat	576
Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Gln Val Met Ala Arg Asp Val Val Tyr	
180 185 190	
ggc ccg aac ggg agt gag aag gag tgg cat agg gtt gtg tgt gag atc	624
Gly Pro Asn Gly Ser Glu Lys Glu Trp His Arg Val Val Cys Glu Ile	
195 200 205	
agg agg gat gga agg aat ggt gga aag gat gtg gag gtg agg ttt cgg	672
Arg Arg Asp Gly Arg Asn Gly Gly Lys Asp Val Glu Val Arg Phe Arg	
210 215 220	
atg gat ggg cag cta gtg gta acg cag tgg ggg aag ggg tat gtt ggg	720
Met Asp Gly Gln Leu Val Val Thr Gln Trp Gly Lys Gly	
225 230 235	
cagccacttt atttgtgagt ttaaacccttt tttttttcct ttttttttct tcttcttctt	780
tcgttgctcg ggtgagggttt ttcgcgttgt cggttgctaa ctggaagggt gatattgcag	840

g att atc aat ctc cag atg gaa ggg tcg tcg ggt tca cct ggt cct gaa 889
 Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Glu
 240 245 250

gcg g gtaagtcaac tataggtctc ttcggttttg tgatggaaga acctgatcgt 943
 Ala

ctcagccggg ccatttgctg acagtgatac agacactttg tatcaag tc cga aat 998
 Val Arg Asn
 255

ctt gag gtc tgg agc tat ggt gac tga gccgtgagca gaggagttgt 1045
 Leu Glu Val Trp Ser Tyr Gly Asp
 260 265

cccttcaaga tgtcca 1061

<210> 8
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
 1 5 10 15

Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu
 20 25 30

Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr
 35 40 45

Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg
 50 55 60

Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala
 85 90 95

Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile
 100 105 110

His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly
 115 120 125

Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala
 130 135 140

Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro
 145 150 155 160

Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys Ile Ser Phe
 165 170 175

Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Gln Val Met Ala Arg Asp Val Val Tyr
 180 185 190
 Gly Pro Asn Gly Ser Glu Lys Glu Trp His Arg Val Val Cys Glu Ile
 195 200 205
 Arg Arg Asp Gly Arg Asn Gly Gly Lys Asp Val Glu Val Arg Phe Arg
 210 215 220
 Met Asp Gly Gln Leu Val Val Thr Gln Trp Gly Lys Gly Ile Ile Asn
 225 230 235 240
 Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Glu Ala Val Arg
 245 250 255
 Asn Leu Glu Val Trp Ser Tyr Gly Asp
 260 265

<210> 9
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen tổng hợp

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1344)

<400> 9	
atg ttg tgg ttg cgc aag gtg atc cct gtt ttc ctc tct ctg gtc gtt	48
Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val	
1 5 10 15	
gcg gcc cgc gcc gag aca cag atc gtc tct ggt gct gct tgg aca gac	96
Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp	
20 25 30	
aca agc gga aac gtc att cag gcc cat ggc gct gga atc ttg aag gtc	144
Thr Ser Gly Asn Val Ile Gln Ala His Gly Ala Gly Ile Leu Lys Val	
35 40 45	
gga agc acg ttt tac tgg ttc ggt gaa gac aag acg gag aac agt gcc	192
Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala	
50 55 60	
ttg ttc cac gca gtg tcg tgc tat aca tct acg gac ctg acg aac tgg	240
Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp	
65 70 75 80	
act cgt caa agc aat gcg ctt tct ccg gtc gcc aac acc atg att tcc	288
Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser	
85 90 95	
tct aac aac atc gtt gag cgt ccc aaa gtt tta ttc aac aag aag aat	336
Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn	
100 105 110	

caa gaa tac gtg atg tgg ttc cat tct gat agt tcc aac tat gga gct Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala 115 120 125	384
gcc atg gtc ggt gtc gca act gcg aaa act ccc tgc ggc ccc tat aca Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr 130 135 140	432
ttc aaa ggc agc ttc aaa cct ctc ggc gca gat tct cgc gat gaa ggg Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly 145 150 155 160	480
ctg ttt cag gat gac gac tcc gca caa acc gcc tac ctt ctc tat gcc Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala 165 170 175	528
tcc gat aac aac cag aac ttc aag ata tca agg ttg gat gac aac tat Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr 180 185 190	576
tac aat gtg act gct cag gct agc gtt ttg acc ggt gcc aca ctt gaa Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu 195 200 205	624
gca ccg ggc att gta aag cac agc gga aaa tac ttc cta atc gcc tcg Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser 210 215 220	672
cac acc agc gga tgg gct ccg aac cca aac aag ttc ttc tca gca tct His Thr Ser Gly Trp Ala Pro Asn Pro Asn Lys Phe Phe Ser Ala Ser 225 230 235 240	720
tcc ttg tcc ggc ccg tgg tcg tct caa caa gat atc acc acc gcg tcc Ser Leu Ser Gly Pro Trp Ser Ser Gln Gln Asp Ile Thr Thr Ala Ser 245 250 255	768
aca cgc acc tgg tac tcg caa aac gca ttc gac ttg cct ctc ggt aat Thr Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Asn Ala Phe Asp Leu Pro Leu Gly Asn 260 265 270	816
aat gcg atc tac atg gga gat agg tgg agg ccc agc tta ctt gga agc Asn Ala Ile Tyr Met Gly Asp Arg Trp Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ser 275 280 285	864
agc cgg tac atc tgg tat cct atc gat ttc tcc agc ggg tcg ccg caa Ser Arg Tyr Ile Trp Tyr Pro Ile Asp Phe Ser Ser Gly Ser Pro Gln 290 295 300	912
ctc gtg cat gcc gat gtg tgg tcg gtg aac ccg tct gcc ggc acg tat Leu Val His Ala Asp Val Trp Ser Val Asn Pro Ser Ala Gly Thr Tyr 305 310 315 320	960
act gtt gct caa gga acc act tac gaa gct gag aag ggt aca ctc ggc Thr Val Ala Gln Gly Thr Thr Tyr Glu Ala Glu Lys Gly Thr Leu Gly 325 330 335	1008
ggg tct tcc aag ctc ttg tcc aat tcg ggg ttc tct ggg ggc agc gca Gly Ser Ser Lys Leu Leu Ser Asn Ser Gly Phe Ser Gly Gly Ser Ala 340 345 350	1056

gta ggt tac ctc ggt cat ggt ggc act gtg acg atc aac aac gtt caa 1104
 Val Gly Tyr Leu Gly His Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Asn Val Gln
 355 360 365

ggc aat gga gga gcg cac tgg gtt gcg atc tat ttt gcc aat ggc gac 1152
 Gly Asn Gly Gly Ala His Trp Val Ala Ile Tyr Phe Ala Asn Gly Asp
 370 375 380

tcc aca tat agg aat gtc acc gtc agc gta aat gga ggc tcc tct gtt 1200
 Ser Thr Tyr Arg Asn Val Thr Val Ser Val Asn Gly Gly Ser Ser Val
 385 390 395 400

ctc gtc gac cag cca gac tct gga gga gga ggc gta gtc att agt gta 1248
 Leu Val Asp Gln Pro Asp Ser Gly Gly Gly Gly Val Val Ile Ser Val
 405 410 415

cct gtc aaa gtg aac ctg aat aat ggc gca aac tcg atc acc ttt ggc 1296
 Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
 420 425 430

tcc gga caa tcc aat tac gct gcc gac ctt gac aag att atc gtc tac 1344
 Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
 435 440 445

tga 1347

<210> 10
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val
 1 5 10 15

Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp
 20 25 30

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

Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala
 50 55 60

Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp
 65 70 75 80

Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser
 85 90 95

Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn
 100 105 110

Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala
 115 120 125

Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr
 130 135 140
 Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly
 145 150 155 160
 Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala
 165 170 175
 Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr
 180 185 190
 Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu
 195 200 205
 Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser
 210 215 220
 His Thr Ser Gly Trp Ala Pro Asn Pro Asn Lys Phe Phe Ser Ala Ser
 225 230 235 240
 Ser Leu Ser Gly Pro Trp Ser Ser Gln Gln Asp Ile Thr Thr Ala Ser
 245 250 255
 Thr Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Asn Ala Phe Asp Leu Pro Leu Gly Asn
 260 265 270
 Asn Ala Ile Tyr Met Gly Asp Arg Trp Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ser
 275 280 285
 Ser Arg Tyr Ile Trp Tyr Pro Ile Asp Phe Ser Ser Gly Ser Pro Gln
 290 295 300
 Leu Val His Ala Asp Val Trp Ser Val Asn Pro Ser Ala Gly Thr Tyr
 305 310 315 320
 Thr Val Ala Gln Gly Thr Thr Tyr Glu Ala Glu Lys Gly Thr Leu Gly
 325 330 335
 Gly Ser Ser Lys Leu Leu Ser Asn Ser Gly Phe Ser Gly Gly Ser Ala
 340 345 350
 Val Gly Tyr Leu Gly His Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Asn Val Gln
 355 360 365
 Gly Asn Gly Gly Ala His Trp Val Ala Ile Tyr Phe Ala Asn Gly Asp
 370 375 380
 Ser Thr Tyr Arg Asn Val Thr Val Ser Val Asn Gly Gly Ser Ser Val
 385 390 395 400
 Leu Val Asp Gln Pro Asp Ser Gly Gly Gly Gly Val Val Ile Ser Val
 405 410 415
 Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
 420 425 430
 Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
 435 440 445

<210> 11
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen tổng hợp

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1224)

<400> 11
 atg agg ttg cag aag gat ttc gat cga gtc atg ggc att atc ttg atg 48
 Met Arg Leu Gln Lys Asp Phe Asp Arg Val Met Gly Ile Ile Leu Met
 1 5 10 15
 att ctc att ctc gca atc ccc tcc ttg cag atc tgt aac aag tcg tac 96
 Ile Leu Ile Leu Ala Ile Pro Ser Leu Gln Ile Cys Asn Lys Ser Tyr
 20 25 30
 act gag ggc gac ccg gtc atc atc aac ccg gtc cct ggc ctc ccc gtc 144
 Thr Glu Gly Asp Pro Val Ile Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45
 gac ttc att cga ggt gtg gat gca tcg gaa gca ccc tgg atc atc gag 192
 Asp Phe Ile Arg Gly Val Asp Ala Ser Glu Ala Pro Trp Ile Ile Glu
 50 55 60
 ttg ggt ggc aag tac tac gac gag aac gga gtc gag agg gat ctc ttg 240
 Leu Gly Gly Lys Tyr Tyr Asp Glu Asn Gly Val Glu Arg Asp Leu Leu
 65 70 75 80
 gac atc ttg aag gaa aac ggc gtg aac tgg atc agg ctc cga gtg tgg 288
 Asp Ile Leu Lys Glu Asn Gly Val Asn Trp Ile Arg Leu Arg Val Trp
 85 90 95
 aac gat cct tat gac gaa cag ggt agg cct tat gga gga ggc aac tgt 336
 Asn Asp Pro Tyr Asp Glu Gln Gly Arg Pro Tyr Gly Gly Gly Asn Cys
 100 105 110
 gat ctc cct cgc atg acc gac ttc gca gca aag gcg aag gcg aaa ggc 384
 Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
 115 120 125
 ttc gga gtg ttg att gat ttc cac tat tcg gat tgg tgg gca gac ccc 432
 Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
 130 135 140
 tcg aaa cag tcg aag ccc aag gcc tgg gcc aac ctc tcg tac ccc gag 480
 Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
 145 150 155 160
 ctc gtg gaa gcg gtc tat aac tgg acc tac aac gcg ttg aag tac atg 528
 Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
 165 170 175
 gcc gag cac aac gca ttg ccc gat atg gtg cag atc gga aac gag att 576
 Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile
 180 185 190

aac aac ggc ttc ctc tgg cct gat ggc tcg gca gcc aac tgg aca cag Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln 195 200 205	624
ttc gtc ggt ttg ttg aaa gca gcc att tcg gca gtg aaa gac gtg aac Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn 210 215 220	672
ccc aac atc aag att gtc atc cat ctc gca gga gtc aag gcg gat ttc Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe 225 230 235 240	720
tac atc aac ttc att gac agg ttg atc aac tcc gga gtc tcc ttc gac Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp 245 250 255	768
gtc atc gca atc tcg ttc tat ccc tat tgg cat ggt acc atg gac gac Val Ile Ala Ile Ser Phe Tyr Pro Tyr Trp His Gly Thr Met Asp Asp 260 265 270	816
ttc agg aac ttg gtg cgc act ctc gtg cag agg tac gat aag aag atc Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile 275 280 285	864
ctc gtc gca gag acc gcg tac gcc tgg acc ctc gat gat tcc gat gga Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly 290 295 300	912
cac ccg aac att ttc ggt tcg agg gac ctc gag gtc aag gga ggt tac His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr 305 310 315 320	960
aaa gcc tcg atc cag gga cag gcc tcg ttc atc cgg gac ctc atc gca Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala 325 330 335	1008
gca ctc tac gag gag ggt aag gat aaa gca ctc ggc atc ttc tac tgg Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp 340 345 350	1056
ggt gca acc tgg att cct tat cct ggt gcc gga tgg aag act ggc gaa Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu 355 360 365	104
gga aac ccc tgg gag aac cag gca ttg ttc gac ttc aac ggt agg gcc Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala 370 375 380	1152
ttg cct tcc ctc aag gtc ttc agg ctc gtg tac gaa gcc cag ccc gtc Leu Pro Ser Leu Lys Val Phe Arg Leu Val Tyr Glu Ala Gln Pro Val 385 390 395 400	1200
gag atc aaa cct ttg gaa ctc taa Glu Ile Lys Pro Leu Glu Leu 405	1224
<210> 12	
<211> 407	
<212> PRT	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Met Arg Leu Gln Lys Asp Phe Asp Arg Val Met Gly Ile Ile Leu Met
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Leu Ala Ile Pro Ser Leu Gln Ile Cys Asn Lys Ser Tyr
 20 25 30

Thr Glu Gly Asp Pro Val Ile Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45

Asp Phe Ile Arg Gly Val Asp Ala Ser Glu Ala Pro Trp Ile Ile Glu
 50 55 60

Leu Gly Gly Lys Tyr Tyr Asp Glu Asn Gly Val Glu Arg Asp Leu Leu
 65 70 75 80

Asp Ile Leu Lys Glu Asn Gly Val Asn Trp Ile Arg Leu Arg Val Trp
 85 90 95

Asn Asp Pro Tyr Asp Glu Gln Gly Arg Pro Tyr Gly Gly Gly Asn Cys
 100 105 110

Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
 115 120 125

Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
 130 135 140

Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
 145 150 155 160

Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
 165 170 175

Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile
 180 185 190

Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln
 195 200 205

Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn
 210 215 220

Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe
 225 230 235 240

Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp
 245 250 255

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

Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile
 275 280 285

Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly
 290 295 300

His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr
 305 310 315 320
 Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala
 325 330 335
 Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp
 340 345 350
 Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu
 355 360 365
 Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala
 370 375 380
 Leu Pro Ser Leu Lys Val Phe Arg Leu Val Tyr Glu Ala Gln Pro Val
 385 390 395 400
 Glu Ile Lys Pro Leu Glu Leu
 405

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 13
 cccttggtcga tgcgatgtat c
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

21

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 14
 atcctcaatt ccgtcgggtcg a

21

<210> 15
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp.

<400> 15

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