



(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)



1-0038318

(51)⁷ C12N 9/24

(13) B

(21) 1-2016-03204

(22) 30/01/2015

(86) PCT/EP2015/051982 30/01/2015

(87) WO/2015/114112 06/08/2015

(30) 1401648.9 31/01/2014 DK

(45) 25/01/2024 430

(43) 27/02/2017 347A

(73) DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

Langebrogade 1 DK-1411 Copenhagen K, Denmark

(72) LORENTSEN, Rikke Hoeegh (DK); ARENT LUND, Susan (DK); NIKOLAEV, Igor (RU); HENDRIK A VAN TUIJL, Jan (NL); KOOPS, Bart (NL).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) BIẾN THỂ CỦA ENZYM XYLANAZA GH10, CHẾ PHẨM ENZYM CHỨA BIẾN THỂ NÀY, CHẾ PHẨM PHỤ GIA DÙNG CHO THỨC ĂN CHĂN NUÔI LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ NGUYÊN LIỆU CHỨA TINH BỘT

(57) Sáng chế đề cập đến enzym xylanaza GH10 biến tính hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza, trong đó xylanaza GH10 biến tính này hoặc phân đoạn của nó có độ bền nhiệt được tăng cường so với enzym xylanaza GH10 gốc, xylanaza GH10 gốc đã được cải biến tại, ít nhất, hai trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (Số ID TRÌNH TỰ 1). Cụ thể, enzym xylanaza biến tính theo sáng chế có các biến tính sau:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L hoặc M (tốt hơn là K79Y, F hoặc V, tốt hơn nữa là Y);

A217Q, E, P, D hoặc M (tốt hơn là A217Q, E hoặc P, tốt hơn nữa là Q); và

T298Y, F hoặc W (tốt hơn là Y hoặc F, tốt hơn nữa là Y).

A

(SỐ ID TRÌNH TỰ 26)

mkssflytasiva*IP*TAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN
SGKWDATEPSQGKFNGSFDQVWNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNDKATLTK
VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAPRAARKADP
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPDGGISQTHLDPGAAGQIQGALTAL
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN
YNPKPAYTAVNALR

B

(SỐ ID TRÌNH TỰ 27)

*IP*TAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP
SQGKFNGSFDQVWNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNDKATLTKVIENHVTQV
GRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAPRAARKADPNAKLYINDYS
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPDGGISQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV
VNALR

C

(SỐ ID TRÌNH TỰ 1)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNGSFDQVWNFAQQ
NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFG
NDDYVGIAPRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPDGGISQTHLDPGAAGQIQGALTAL
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV
VNALR

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các xylanaza mới có tính bền nhiệt và việc sử dụng xylanaza này trong các ứng dụng, bao gồm các ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi, trong quy trình nấu rượu bia hay tạo mạch nha, trong xử lý arabinoxylan chứa nguyên liệu như nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc, ví dụ trong sản xuất nhiên liệu sinh học hoặc các sản phẩm lên men khác, bao gồm các chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học), và/hoặc trong ngành công nghiệp tách gluten-tinh bột lúa mì, và các phương pháp sử dụng các xylanaza này, cũng như các chế phẩm (như chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi) chứa các xylanaza này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong nhiều năm, endo- β -1,4-xylanaza (EC 3.2.1.8) (sau đây được gọi là xylanaza) đã được sử dụng để cải biến hydrat cacbon phức có nguồn gốc từ vật liệu thành tế bào thực vật. Trong ngành, chúng ta biết rõ rằng chức năng của các xylanaza khác nhau (có nguồn gốc từ các vi sinh vật hoặc thực vật khác nhau) sẽ khác nhau rõ rệt. Xylanaza là tên được đặt cho một loại enzyme phân giải polysaccharit β -1,4-xylan tuyến tính thành xylooligosaccharit hoặc xyloza, từ đó phá vỡ hemixenluloza, một trong những thành phần chính của thành tế bào thực vật.

Dựa trên thông tin cấu trúc và thông tin di truyền, xylanaza được phân loại thành các họ Glycosit Hydrolaza (GH) khác nhau (Henrissat, (1991) *Biochem. J.* (Tập chí Hóa sinh học) **280**, 309-316).

Ban đầu tất cả các xylanaza đã biết và đặc trưng đều thuộc các họ GH10 hoặc GH11. Các nghiên cứu sau này đã nhận dạng các loại xylanaza khác thuộc các họ GH5, GH7, GH8 và GH43 (Collins và cộng sự (2005) *FEMS Microbiol Rev.* (Tập chí Vi sinh vật học FEMS), **29** (1), 3-23).

Cho đến nay họ GH11 khác với tất cả các họ GH khác, là họ duy nhất chỉ bao gồm xylanaza đặc hiệu xylan. Cấu trúc của xylanaza GH11 có thể được mô tả là cấu trúc dạng trục keo đông β hoặc cấu trúc cuộn gấp tầng kẹp sợi β (Himmel và cộng sự, 1997 Appl. Biochem. Biotechnol. (Công nghệ sinh học và Hóa sinh học ứng dụng) 63-65, 315-325). Enzym GH11 có miền xúc tác bằng khoảng 20 kDa.

Xylanaza GH10 có miền xúc tác có khối lượng phân tử nằm trong khoảng 32-39 kDa. Cấu trúc của miền xúc tác của xylanaza GH10 bao gồm barrel β/α 8 vòng (Harris và cộng sự 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D (Tạp chí Tinh thể học Phần D) 52, 393-401).

Một số lượng lớn các enzym họ GH10 có cấu trúc 3 chiều, được phân giải trước tiên là các cấu trúc của xylanaza A của *Streptomyces lividans* (Derewenda và cộng sự, J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học), 19/08/1994; 269(33) 20811-4), endo-glycanase Cex của *C. fimi* (White và cộng sự, Biochemistry (Sinh hóa học), 25/10/1994; 33(42) 12546-52), và Xyn10A của *Cellvibrio japonicus* (trước đây là phân loài xylanaza A của *Pseudomonas fluorescens*) (Harris và cộng sự, Structure (Cấu trúc), 15/11/1994; 2(11) 1107-16.). Là thành viên của họ GHA, chúng có cuộn gấp TIM barrel $(\alpha/\beta)_8$ kiểu cổ điển với các axit glutamic ở hai điểm hoạt hóa chính nằm tại đầu C của sợi beta 4 (axit/bazo) và 7 (ái nhân) (Henrissat và cộng sự, Proc Natl Acad Sci U S A (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ), 18/07/1995; 92(15) 7090-4).

Các nghiên cứu toàn diện định rõ đặc trưng của chức năng của xylanaza đã được thực hiện trên các cơ chất tinh khiết và cực kỳ đặc trưng (Kormelink và cộng sự, 1992, Đặc trưng hóa và phương thức hoạt động của xylanaza và một số enzym phụ. Giáo Sư Thesis, Agricultural University Wageningen, Hà Lan (Tr. 175, bản tóm tắt Tiếng Anh và Tiếng Hà Lan)). Các nghiên cứu này chỉ ra rằng các xylanaza khác nhau có các yêu cầu cụ thể khác nhau theo sự thể khung xyloza của arabinoxylan (AX). Một số xylanaza yêu cầu 3 gốc xyloza không được thể để thủy phân khung xyloza; các xylanaza khác chỉ yêu cầu một hoặc hai gốc. Lý do dẫn đến các khác biệt này trong tính đặc hiệu được cho là do cấu trúc ba chiều bên trong các miền xúc tác gây ra, các miền này ngược lại lại phụ thuộc vào cấu trúc bậc một của xylanaza, tức là trình tự axit amin. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bằng chứng được ghi lại về sự dịch mã các khác biệt này trong trình tự axit amin thành các khác biệt trong chức năng của các xylanaza khi xylanaza hoạt động trong môi trường phức tạp, như trong nguyên liệu thực vật, ví dụ trong thức ăn chăn nuôi.

Các cơ chất xylanaza trong nguyên liệu thực vật, ví dụ, trong lúa mì, thường được chia thành hai phần cát: Phần cát không thể chiết xuất trong nước AX (WU-AX) và phần cát có thể chiết xuất trong nước AX (WE-AX). Có rất nhiều cách giải thích tại sao lại có hai phần cát AX khác nhau. Tài liệu trước kia (D'Appolonia và MacArthur - (1976, Cereal Chem. (Hóa học ngũ cốc) 53. 711-718) và Montgomery và Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. (Tạp chí Hội hóa học Hoa Kỳ) 77. 3325-332) mô tả sự khác biệt khá cao trong mức độ thể giữa WE-AX và WU-AX. Mức độ thể cao nhất được phát hiện trong WE-AX. Điều này được sử dụng để giải thích tại sao một số AX lại có thể chiết xuất được. Mức độ thể cao khiến polyme tan được, so với mức thể thấp hơn, mức này có thể tạo ra liên kết hydro giữa các polyme và cuối cùng dẫn đến kết tủa.

Sự khác biệt giữa chức năng của các xylanaza khác nhau được cho là do sự khác biệt trong tính đặc hiệu của xylanaza và từ đó dẫn tới các ưu tiên đối với các cơ chất WU-AX hoặc WE-AX.

Các enzym xylanaza đã được ghi nhận từ gần 100 vi sinh vật khác nhau, bao gồm thực vật, nấm và vi khuẩn. Các enzym xylanaza được phân loại thành một số trong hơn 40 họ enzym glycosyl hydrolaza. Enzym glycosyl hydrolaza bao gồm xylanaza, mannanase, amylaza, β -glucanase, xenlulaza, và hydrat cacbon khác, được phân loại dựa trên các tính chất như trình tự các axit amin, cấu trúc 3 chiều của chúng và hình dạng của vị trí xúc tác của chúng (Gilkes, và cộng sự, 1991, Microbiol. Reviews (Tạp chí vi sinh vật học) 55: 303-315).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Kết quả quan trọng của sáng chế là sự cải biến xylanaza GH10, giúp xylanaza GH10 có tính bền nhiệt hơn.

Lần đầu tiên, các nhà sáng chế đã xác định được các gốc chính cho phép cải biến khiến cho xylanaza GH10 có tính bền nhiệt hơn.

Ngoài ra, lần đầu tiên, các nhà sáng chế đã xác định các thay thế/cải biến chính khiến cho xylanaza GH10 có tính bền nhiệt hơn.

Cụ thể là, sáng chế liên quan đến việc nhận dạng các gốc đặc hiệu trong và các cải biến đặc hiệu của xylanaza, ví dụ xylanaza GH10, để khiến nó có tính bền nhiệt hơn, trong khi vẫn đảm bảo không thay đổi các tính chất khác của xylanaza.

Các tính chất khác của xylanaza của sáng chế là khả năng phá vỡ (hòa tan) các arabinoxylan không tan (AXinsol).

Cụ thể, các xylanaza biến thể của sáng chế có thể phá vỡ (hòa tan) hiệu quả AXinsol trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm ngô, lúa mì, DDGS, v.v., cụ thể là ngô và các cơ chất gốc ngô, cụ thể là cả sản phẩm từ lúa mì (bao gồm sản phẩm sản xuất từ lúa mì) và ngô (bao gồm sản phẩm sản xuất từ ngô). Điều này trái ngược với các enzym đã biết trước đây, các enzym này thường kém trong hòa tan AXinsol trong ngô hoặc cơ chất gốc ngô hoặc không có hiệu quả trong các cơ chất có gốc là lúa mì và ngô.

Ngoài ra, các xylanaza biến thể của sáng chế đặc biệt mạnh ở chỗ không chỉ phá vỡ (hòa tan) AXinsol, mà còn có khả năng phá vỡ (hay phân giải) các polyme được hòa tan một cách hiệu quả. Do có khả năng phá vỡ (phân giải) hiệu quả (nhanh chóng) các polyme hòa tan (thu được từ bước hòa tan AXinsol), độ nhớt sẽ giảm (nhanh) hoặc các polyme hòa tan (thu được từ bước hòa tan AXinsol) sẽ không thể khiến cho độ nhớt tăng. Hiệu quả sau rất quan trọng trong một số ứng dụng được yêu cầu bảo hộ.

Không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, enzym biến thể của sáng chế chủ yếu sẽ giải phóng các polyme, các polyme này không có ảnh hưởng tới độ nhớt do chúng là polyme ngắn.

Nhìn chung, xylanaza thông thường có thể phá vỡ AXinsol, nhưng thường sẽ làm tăng độ nhớt của hỗn hợp. Độ nhớt tăng là điều bất lợi trong nhiều ứng dụng.

Không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, mặc dù một số xylanaza thông thường có thể phá vỡ AXinsol, nhưng chúng sẽ làm tăng các sản phẩm phân giải có tính tan có khối lượng phân tử cao, dẫn tới làm tăng độ nhớt của hỗn hợp.

Ngoài ra, hay hoặc là, và tiếp tục không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, mặc dù một số enzym xylanaza thông thường có thể phá vỡ AXinsol, nhưng do chúng không phân giải đủ nhanh các sản phẩm được hòa tan có khối lượng phân tử cao nên hỗn hợp sẽ có độ nhớt không lý tưởng. Ngược lại, với các phương pháp và cách sử dụng của sáng chế, các xylanaza biến thể có thể phá vỡ AXinsol mà không làm tăng độ nhớt và/hoặc sẽ làm giảm độ nhớt nhanh chóng so với các enzym thông thường. Không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, người ta cho rằng các enzym của sáng chế không tạo thành các sản phẩm có khối lượng phân tử cao.

Các enzym của sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này được phát hiện là không những có thể phá vỡ (hòa tan) các arabinoxylan (AXinsol) không tan trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm ngô, lúa mì, DDGS, v.v., cụ thể là ngô và các

cơ chất gốc ngô, cụ thể là cả sản phẩm từ lúa mì (bao gồm sản phẩm sản xuất từ lúa mì) và ngô (bao gồm sản phẩm sản xuất từ ngô), mà còn có thể đảm bảo một cách hiệu quả là sẽ không làm tăng độ nhớt và/hoặc đảm bảo làm giảm độ nhớt. Không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, người ta cho rằng các enzym của sáng chế không tạo thành các sản phẩm có khối lượng phân tử cao.

Do đó sáng chế đề cập đến các enzym có khả năng hòa tan các pentosan, cụ thể là các nguyên liệu chứa xylan, như các arabinoxylan, cụ thể là arabinoxylan không tan. Cụ thể, enzym đặc biệt mạnh trong việc làm hòa tan pentosan, cụ thể là trong các nguyên liệu chứa xylan, như các arabinoxylan, cụ thể là arabinoxylan không tan, trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm các cơ chất gốc ngô.

Sáng chế còn đề cập đến các enzym có khả năng phân giải AXsol hoặc sản phẩm bị phá vỡ của AXinsol để đảm bảo độ nhớt sẽ không tăng và/hoặc sẽ giảm trong hỗn hợp phản ứng.

Nhiều xylanaza được thương mại hóa để sử dụng trong thức ăn chăn nuôi để hòa tan pentosan là các enzym GH11. Các chuyên gia trong ngành đã cho rằng xylanaza GH10 không mạnh bằng xylanaza GH11 trong việc làm hòa tan các pentosan, cụ thể là AXinsol. Thật ngạc nhiên là người ta đã phát hiện ra loại xylanaza mới như được mô tả trong bản mô tả này, đó chính là xylanaza GH10, đặc biệt mạnh trong khả năng phân giải AXinsol trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm các cơ chất gốc ngô. Thậm chí, các nhà sáng chế đã phát hiện rằng xylanaza GH10 biến thể của sáng chế còn vượt trội xylanaza GH11 thương mại trong khả năng làm hòa tan pentosan. Ngoài ra, các xylanaza GH10 biến thể còn có tính bền nhiệt.

Thực tế các enzym này phân giải hiệu quả AXinsol từ ngô và cơ chất gốc ngô là một ưu điểm đáng kể do ngô có nhiều AX dưới dạng không tan hơn rất nhiều so với các ngũ cốc khác, ví dụ như lúa mì và lúa mạch đen. Do đó chỉ các xylanaza có thể phá vỡ AXinsol mới có thể mang lại lợi ích đáng kể đối với động vật được nuôi bằng khẩu phần ăn có nguồn gốc từ ngô, ví dụ khẩu phần đậu nành - ngô.

Thật bất ngờ khi xylanaza GH10 lại mạnh đến thế trong phân giải AXinsol trong ngũ cốc, cụ thể trong ngô và trong cơ chất gốc ngô.

Các enzym của sáng chế có thể phân giải hiệu quả (và nhanh chóng) polyme và oligome được sản sinh từ việc phân giải AXinsol hoặc có mặt trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc. Điều này dẫn tới ưu điểm bất ngờ của các xylanaza GH10 đề cập trong bản mô tả này ở chỗ chúng đặc biệt mạnh trong một số ứng dụng duy trì độ nhớt

thấp hoặc giảm độ nhớt, ví dụ trong thức ăn chăn nuôi; trong ngành nấu bia rượu hoặc tạo mạch nha; trong sản xuất glucoza từ ngũ cốc, ví dụ trong chế biến chuyên sâu đối với nhiên liệu sinh học và/hoặc các chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học); hoặc trong ngành công nghiệp tách gluten-tinh bột lúa mì, ví dụ, để sản xuất tinh bột.

Đáng chú ý là đã phát hiện ra rằng sản phẩm phân giải có độ dài trung bình ngắn hơn đối với enzym GH10 được thử nghiệm trong bản mô tả so với enzym GH11. Điều này có nghĩa là sản phẩm phân giải không góp phần hoặc không là nguyên nhân làm tăng độ nhớt.

Dựa trên các kết quả này, các xylanaza biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phân giải nguyên liệu chứa xylan, cụ thể là các arabinoxylan, cụ thể là AXinsol. Ngoài ra, hay hoặc là, các xylanaza theo sáng chế có thể được sử dụng để phân giải polyme tan (ví dụ oligome) được sản sinh từ sự phân giải AXinsol hoặc có mặt (một cách tự nhiên) trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc. Đáng ngạc nhiên là người ta đã phát hiện rằng các xylanaza biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phân giải nguyên liệu chứa xylan, cụ thể là các arabinoxylan, cụ thể là AXinsol, và để phân giải polyme tan (ví dụ oligome) được sản sinh từ sự phân giải AXinsol.

Các enzym này được ứng dụng một cách hữu ích trong nhiều ngành, bao gồm ngành sản xuất thức ăn chăn nuôi, ngành nấu rượu bia hay tạo mạch nha, trong xử lý arabinoxylan chứa nguyên liệu như nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc, trong bản mô tả này nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc bao gồm thóc lúa và ngũ cốc, trong ngành công nghiệp tách gluten-tinh bột từ lúa mì, trong sản xuất si-rô chiết xuất từ tinh bột, trong sản xuất nhiên liệu sinh học, v.v.

Thuật ngữ "(các) xylanaza biến thể" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể được sử dụng thay thế với "(các) xylanaza cải biến".

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất enzym xylanaza GH10 cải biến hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza, trong đó enzym xylanaza GH10 cải biến hoặc phân đoạn của nó được tăng cường tính bền nhiệt so với enzym xylanaza GH10 gốc, enzym xylanaza GH10 gốc đã được cải biến ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) vị trí trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic (ví dụ phân tử axit nucleic phân lập hoặc tái tổ hợp) mã hóa xylanaza bền nhiệt và bao gồm (hoặc gồm

có) trình tự polynucleotit khung bao gồm (hoặc gồm có) trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:

- a. trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc
- b. trình tự nucleotit có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc
- c. trình tự nucleotit có thể được lai hóa thành SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33 trong các điều kiện cực kỳ nghiêm ngặt;

trong đó trình tự polynucleotit khung được cải biến ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) trong số các codon mã hóa axit amin 7, 33, 79, 217 và 298 trong polypeptit được mã hóa, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vector (ví dụ plasmid) hoặc cấu trúc bao gồm (hoặc gồm có) trình tự polynucleotit khung bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:

- a. trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc
- b. trình tự nucleotit có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc

- c. trình tự nucleotit có thể được lai hóa thành SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33 trong các điều kiện cực kỳ nghiêm ngặt;

trong đó trình tự polynucleotit khung được cải biến ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) trong số các codon mã hóa axit amin 7, 33, 79, 217 và 298 trong polypeptit được mã hóa, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector hoặc cấu trúc theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng cường độ ổn định nhiệt của xylanaza GH10, bao gồm: bước cải biến xylanaza GH10 gốc ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) vị trí trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất enzym có hoạt tính xylanaza, trong đó enzym này là xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó, enzym này có sự cải biến ở ít nhất hai (thích hợp là ít nhất ba, thích hợp nữa là ít nhất năm) vị trí trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1), và enzym này có độ ổn định nhiệt được tăng cường so với xylanaza GH10 bao gồm trình tự axit amin đồng nhất với enzym này nhưng không có các cải biến đã nêu.

Sáng chế còn đề xuất enzym xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza trong đó enzym xylanaza GH10 này bao gồm polypeptit có ít nhất 70% (thích hợp là ít nhất 80%, thích hợp là ít nhất 90%, thích hợp là ít nhất 95%, thích hợp là ít nhất 98%, thích hợp là ít nhất 99%) đồng nhất với xylanaza GH10 (ví dụ xylanaza GH10 gốc); và bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (thích hợp là ít nhất ba, thích hợp là tất cả) vị trí được chỉ thị: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L hoặc M (tốt hơn là 79Y, F hoặc V, tốt hơn nữa là Y); 217Q, E, P, D hoặc M (tốt hơn là 217Q, E hoặc P, tốt hơn nữa là Q); và 298Y, F hoặc W (tốt hơn là Y hoặc F, tốt hơn nữa là Y) trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo phương án khác nữa, sáng chế còn đề xuất enzym xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza trong đó enzym xylanaza GH10 này bao gồm polypeptit có ít nhất 90% (thích hợp là ít nhất 95%, thích hợp là ít nhất 98%, thích hợp

là ít nhất 99%) đồng nhất với xylanaza GH10 (ví dụ xylanaza GH10 khung hoặc xylanaza GH10 gốc); và bao gồm ít nhất các axit amin sau ở ít nhất hai (thích hợp là ít nhất ba, thích hợp là tất cả) vị trí được chỉ thị: 7D, 33V, 79Y, 217Q); và 298Y, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Đồng thời sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất biến thể xylanaza, bao gồm:

- a. bước cải biến (ví dụ, biến nạp) tế bào chủ bằng phân tử axit nucleic theo sáng chế, hoặc vectơ hoặc cấu trúc (ví dụ cấu trúc ADN) theo sáng chế, hoặc bằng cấu trúc ADN bao gồm vùng khởi động có hoạt tính phiên mã trong tế bào chủ có thể liên kết với trình tự polynucleotit không tương đồng theo sáng chế, hoặc bằng cấu trúc ADN bao gồm vùng khởi động có hoạt tính phiên mã trong tế bào chủ có thể liên kết với trình tự polynucleotit không tương đồng mã hóa biến thể xylanaza theo sáng chế;
- b. bước nuôi cấy tế bào chủ cải biến (ví dụ, biến nạp) trong môi trường nuôi cấy phù hợp để cho phép biểu hiện xylanaza.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất sản phẩm lên men được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất xylanaza được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm enzym bao gồm a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế hoặc c) kết hợp các sản phẩm này.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi bao gồm a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế hoặc c) kết hợp các sản phẩm này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp sơ chế bao gồm a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế, c) chế phẩm enzym theo sáng chế, d) chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế hoặc e) kết hợp các sản phẩm này; và ít nhất một vitamin và/hoặc ít nhất một khoáng chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn gia súc (hay thức ăn chăn nuôi) bao gồm a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men

theo sáng chế, c) chế phẩm enzym theo sáng chế, d) chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, e) hỗn hợp sơ chế theo sáng chế hoặc f) kết hợp các sản phẩm này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến thức ăn chăn nuôi bao gồm bước trộn thành phần thức ăn chăn nuôi với a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế, c) chế phẩm enzym theo sáng chế, d) chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, e) hỗn hợp sơ chế theo sáng chế hoặc f) kết hợp các sản phẩm này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân giải nguyên liệu chứa arabinoxylan trong nguyên liệu chứa xylan, bao gồm bước trộn nguyên liệu chứa xylan này với a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế, c) chế phẩm enzym theo sáng chế, d) chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, e) hỗn hợp sơ chế theo sáng chế hoặc f) kết hợp các sản phẩm này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng a) enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, b) sản phẩm lên men theo sáng chế, c) chế phẩm enzym theo sáng chế, d) chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế, e) hỗn hợp sơ chế theo sáng chế hoặc f) kết hợp các sản phẩm này để hòa tan arabinoxylan trong nguyên liệu chứa xylan.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 26) của xylanaza của sáng chế (FveXyn4). Phần gạch chân (chữ thường) của trình tự phản ánh peptit tín hiệu của đầu N có thể bị tách ra trước khi enzym trưởng thành. Axit amin được thể hiện bằng chữ nghiêng in đậm cũng có thể bị tách ra do điều hòa sau khi dịch mã trước khi enzym trưởng thành hoàn toàn. Trong một số phương án, trình tự này có thể là trình tự khung.

Hình 1B mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 27) của xylanaza của sáng chế (FveXyn4). Axit amin được thể hiện bằng chữ nghiêng in đậm cũng có thể bị tách ra do điều hòa sau khi dịch mã trước khi enzym trưởng thành hoàn toàn. Trong một số phương án, trình tự này có thể là trình tự khung.

Hình 1C mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 1) của xylanaza, được gọi là FveXyn4 trong bản mô tả này. Đây là dạng hoạt hóa của enzym. Trong bản

mô tả này, đây có thể được gọi là dạng trưởng thành của enzym (trong một số phương án, trình tự này là trình tự khung).

Hình 2A mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 24) mã hóa xylanaza của sáng chế (FveXyn4). Các nucleotit chữ thường in đậm thể hiện trình tự intron (vùng không mã hóa axit amin). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa).

Hình 2B mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 25) mã hóa xylanaza của sáng chế (FveXyn4). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa).

Hình 2C mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 2) mã hóa xylanaza, trong bản mô tả này được gọi là FveXyn4.

Hình 3A mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 28) của xylanaza của sáng chế (FoxXyn2). Phần gạch chân (chữ thường) của trình tự phản ánh peptit tín hiệu đầu N có thể bị tách ra trước khi enzym trưởng thành. Axit amin được thể hiện bằng chữ nghiêng in đậm cũng có thể bị tách ra do điều hòa sau khi dịch mã trước khi enzym trưởng thành hoàn toàn. Trong một số phương án, trình tự này là trình tự khung.

Hình 3B mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 29) của xylanaza của sáng chế (FoxXyn2). Axit amin được thể hiện bằng chữ nghiêng in đậm, cũng có thể bị tách ra do điều hòa sau khi dịch mã trước khi enzym trưởng thành hoàn toàn. Trình tự này có thể là dạng hoạt hóa của protein và có thể là một dạng hoạt hóa của protein. Đây có thể được gọi là dạng trưởng thành của enzym trong bản mô tả này. Trong một số phương án, trình tự này là trình tự khung.

Hình 3C mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 3) của xylanaza, được gọi là FoxXyn2 trong bản mô tả này. Đây là dạng hoạt hóa khác của enzym. Trong một số phương án, đây có thể được gọi là dạng trưởng thành của enzym trong bản mô tả này. Trong một số phương án, trình tự này là trình tự khung.

Hình 4A mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 30) mã hóa xylanaza của sáng chế (FoxXyn2). Các nucleotit chữ thường in đậm thể hiện trình tự intron (vùng không mã hóa axit amin). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa).

Hình 4B mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 31) mã hóa xylanaza của sáng chế (FoxXyn2). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa).

Hình 4C mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 4) mã hóa xylanaza, được gọi là FoxXyn2 trong bản mô tả này.

Hình 5 mô tả trình tự chuỗi polypeptit (SỐ ID TRÌNH TỰ 5) của xylanaza từ nấm Fusarium - Dự án giải trình tự so sánh nấm Fusarium, Viện nghiên cứu Broad

Institute of Harvard và MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Trong một số phương án, trình tự này là trình tự khung.

Hình 6A mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 32) mã hóa xylanaza để sử dụng trong sáng chế từ nấm Fusarium - thu được từ Dự án giải trình tự so sánh nấm Fusarium, Viện nghiên cứu Broad Institute of Harvard và MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Các nucleotit chữ thường in đậm thể hiện trình tự intron (vùng không mã hóa axit amin). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa). Các thay đổi được so sánh với SỐ ID TRÌNH TỰ 24 được gạch chân.

Hình 6B mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 33) mã hóa xylanaza để sử dụng trong sáng chế từ nấm Fusarium - thu được từ Dự án giải trình tự so sánh nấm Fusarium, Viện nghiên cứu Broad Institute of Harvard và MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu được in đậm (chữ in hoa). Các thay đổi được so sánh với SỐ ID TRÌNH TỰ 25 được gạch chân.

Hình 6C mô tả trình tự nucleotit (SỐ ID TRÌNH TỰ 6) mã hóa xylanaza để sử dụng trong sáng chế từ nấm Fusarium - thu được từ Dự án giải trình tự so sánh nấm Fusarium, Viện nghiên cứu Broad Institute of Harvard và MIT (<http://www.broadinstitute.org/>), các thay đổi được so sánh với SỐ ID TRÌNH TỰ 4 được gạch chân.

Hình 7 mô tả sự bắt cặp của các protein trưởng thành đối với FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1), FoxXyn2 (SỐ ID TRÌNH TỰ 3) và xylanaza được thể hiện trong bản mô tả này là SỐ ID TRÌNH TỰ 5 (FVEG_13343T0).

Hình 8 mô tả trình tự nucleotit (không có các intron) của trình tự mã hóa xylanaza GH10 biến thể theo sáng chế (SỐ ID TRÌNH TỰ 7, SỐ ID TRÌNH TỰ 8, SỐ ID TRÌNH TỰ 9, SỐ ID TRÌNH TỰ 10, và SỐ ID TRÌNH TỰ 11).

Hình 9 mô tả trình tự nucleotit (có các intron được gạch chân) của trình tự mã hóa xylanaza GH10 biến thể theo sáng chế (SỐ ID TRÌNH TỰ 12, SỐ ID TRÌNH TỰ 13, SỐ ID TRÌNH TỰ 14, SỐ ID TRÌNH TỰ 15, và SỐ ID TRÌNH TỰ 16). Hình 10 mô tả trình tự axit amin của xylanaza GH10 biến thể trưởng thành theo sáng chế (SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20, và SỐ ID TRÌNH TỰ 21).

Hình 11 thể hiện giá trị T_m của 5 biến thể A, B, C, D, và E so với FveXyn4. Giá trị T_m được đo là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ.

Hình 12 mô tả đường cong pH của 5 biến thể được đo tại pH bằng 4,0, 5,0 và 6,0 và tất cả dữ liệu liên quan đến FveXyn4 ở mức pH bằng 5,0.

Các Hình 13a và b mô tả sự hòa tan của pentosan từ DDGS ngô (phần trên - Hình 13a) và vỏ cám lúa mì (phần dưới, Hình 13b) là hàm của liều lượng xylanaza.

Hình 14 mô tả sự giảm độ nhớt trong Giảm độ nhớt trong xét nghiệm mẫu động vật *trong ống nghiệm* được cho trong Ví dụ 1 bởi các biến thể của sáng chế và được so với FveXyn4 và Econase XT chuẩn. Mức giảm độ nhớt được đo trên lúa mì có độ nhớt cao.

Hình 15 mô tả sự thu hồi xylanaza sau khi tạo viên thức ăn gia súc ở 90 và 95°C. Hoạt tính được trình bày theo mẫu dịch ngâm. Các mẫu chứa FveXyn4 được phân tích bằng phương pháp chiết, trong khi các mẫu chứa biến thể A-E được phân tích bằng phương pháp huyền phù đặc, cả hai phương pháp được mô tả trong nguyên liệu và phương pháp của Ví dụ 1.

Hình 16 minh họa sơ đồ plasmit của pZZH254.

Hình 17 minh họa đường cong nhiệt độ của FveXyn4.

Hình 18 minh họa sơ đồ plasmit của pZZH135.

Hình 19 minh họa đường cong nhiệt độ của FoxXyn2.

Hình 20 minh họa sơ đồ của pEntry-FveXyn4.

Hình 21 minh họa sơ đồ của vector pTTTpyr2 đích và vector biểu hiện đối với FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4) và các biến thể FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4_VAR).

Hình 22 minh họa sự giảm độ nhớt trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc của enxym khung (mẹ) FveXyn4 so với các biến thể bền nhiệt A, B, C, D, và E theo sáng chế. Fve Xyn4 và các biến thể hoạt động theo cùng phương thức, cho thấy mức giảm độ nhớt 55-67% so với trị trống (chỉ dành cho SPEZYME® CL).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của chuyên gia trong ngành mà sáng chế này thuộc về. Singleton, và *cộng sự*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, (TỪ ĐIỂN SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ VI SINH VẬT HỌC) LẦN XUẤT BẢN THỨ 20, John Wiley and Sons, New York (1994), và Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (TỪ ĐIỂN SINH HỌC HARPER COLLINS), Harper Perennial, NY (1991) cung cấp cho

các chuyên gia từ điển tổng quát với nhiều thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu công bố này.

Tài liệu công bố này không giới hạn trong các phương pháp và nguyên liệu ví dụ được mô tả trong bản mô tả này, và phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm các phương án của bản công bố sáng chế này. Các khoảng giá trị số bao gồm các số xác định khoảng giá trị số. Trừ khi được quy định khác, trình tự axit nucleic bất kỳ được viết từ trái sang phải theo hướng 5' đến 3'; trình tự axit amin được viết lần lượt từ trái sang phải lần lượt theo hướng amino đến carboxy.

Các đề mục nhỏ trong bản mô tả này không hạn chế các phương diện hoặc phương án khác nhau của bản công bố này, đồng thời có thể thực hiện được chúng bằng cách viện dẫn tới toàn bộ bản mô tả. Theo đó, các thuật ngữ được định nghĩa ngay dưới đây được định nghĩa đầy đủ hơn bằng cách viện dẫn tới toàn bộ bản mô tả.

Axit amin được đề cập đến trong bản mô tả này bằng việc sử dụng tên của axit amin, chữ viết tắt 3 chữ cái hoặc chữ viết tắt 1 chữ cái.

Thuật ngữ "protein", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm protein, polypeptit, và peptit.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "trình tự axit amin" đồng nghĩa với thuật ngữ "polypeptit" và/hoặc thuật ngữ "protein". Trong một số trường hợp, thuật ngữ "trình tự axit amin" đồng nghĩa với thuật ngữ "peptit". Trong một số trường hợp, thuật ngữ "trình tự axit amin" đồng nghĩa với thuật ngữ "enzym".

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein" và "polypeptit" được sử dụng thay thế cho nhau. Trong bản công bố này và các yêu cầu bảo hộ, có thể sử dụng các mã 1 chữ cái và 3 chữ cái thông thường dành cho các gốc axit amin. Mã 3 chữ cái cho axit amin được xác định tuân thủ theo IUPACIUB Joint Commission về Danh pháp hoá sinh (IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN). Cũng có thể hiểu rằng polypeptit có thể được mã hóa bởi nhiều hơn một trình tự nucleotit do sự suy biến của mã di truyền.

Các định nghĩa thuật ngữ khác có thể xuất hiện trong toàn bộ bản mô tả. Trước khi các phương án ví dụ được mô tả chi tiết hơn, cần phải hiểu rằng bản công bố này không giới hạn trong các phương án cụ thể được mô tả, do đó, dĩ nhiên có thể được biến đổi. Cũng cần phải hiểu rằng hệ thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ

để nhằm mô tả các phương án cụ thể, chứ không có ý giới hạn, do phạm vi của sáng chế sẽ chỉ được giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ trong bản công bố này.

Khi khoảng giá trị số được cung cấp, cần phải hiểu rằng mỗi giá trị xen kẽ, bằng đến một phần mười đơn vị của giá trị giới hạn dưới, trừ khi ngữ cảnh quy định khác, giữa giá trị giới hạn trên và dưới của khoảng số, đương nhiên cũng được công bố. Mỗi khoảng nhỏ hơn giữa giá trị hoặc giá trị xen kẽ được nêu bất kỳ trong khoảng được nêu và giá trị hoặc giá trị xen kẽ được nêu khác bất kỳ trong khoảng được nêu đó đều được bao gồm trong bản công bố sáng chế này. Các giá trị trên và dưới của các khoảng nhỏ hơn này, một cách độc lập, cũng có thể có hoặc không có trong khoảng, và mỗi khoảng có một trong hai hoặc không có cả hai giới hạn có mặt trong các khoảng nhỏ hơn này cũng được bao gồm trong bản công bố sáng chế này, theo giới hạn loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng được nêu. Khi khoảng được nêu bao gồm một hoặc hai giới hạn, các khoảng không bao gồm một hoặc cả hai giới hạn bao gồm này cũng được bao gồm trong bản công bố sáng chế này.

Cần lưu ý là khi được sử dụng trong bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ đính kèm, dạng số ít "một" bao gồm cả các số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định khác. Do đó, ví dụ, tham chiếu đến "enzym" bao gồm nhiều ứng viên của chất này và tham chiếu đến "thức ăn chăn nuôi" bao gồm tham chiếu đến một hay nhiều thức ăn chăn nuôi và các loại tương đương mà chuyên gia trong ngành đều biết, và cứ như thế.

Các văn bản được trình bày trong bản mô tả này được cung cấp chỉ với mục đích là công bố thông tin trước ngày nộp đơn xin cấp bằng sáng chế này. Không có nội dung nào trong bản mô tả này cho phép các văn bản đó tạo thành kỹ thuật trước đây đối với các yêu cầu bảo hộ của bản công bố sáng chế này.

Việc tăng giá nguyên liệu thường được dùng làm nguồn năng lượng trong thức ăn động vật, làm nguyên liệu cấp trong sản xuất nhiên liệu sinh học, làm thành phần trong quy trình nấu rượu bia hay tạo mạch nha, hoặc ví dụ, làm nguyên liệu cấp trong các quy trình tách gluten-tinh bột lúa mì, đã dẫn đến việc sử dụng các nguyên liệu chất xơ giá thấp trong các cơ chất đầu vào cho các ngành công nghiệp này, cụ thể là việc sử dụng các phụ phẩm là chất xơ giá thấp trong thức ăn chăn nuôi.

Việc bổ sung chất xơ có thể gây ra một số hiệu ứng không có lợi. Ví dụ trong thức ăn chăn nuôi, việc bổ sung chất xơ có thể gây ra hiệu ứng kháng dinh dưỡng. Sự có mặt của các polyme không được phân giải trong ruột động vật sẽ tạo ra hỗn hợp có độ nhớt cao và làm trở ngại việc khuếch tán, kết quả là giảm hấp thu chất dinh dưỡng. Đồng thời, các polyme cũng có khả năng giữ nước cao làm cản trở việc tái hấp thu nước hiệu quả, và việc

giữ nước này làm tăng lượng chứa trong ruột, dẫn tới giảm thời gian trung chuyển trong ruột (Englyst & Kingman (1993) trong Human Nutrition and Dietetics (Khoa dinh dưỡng và Dinh dưỡng cho con người), ấn bản lần thứ 9 (BTV Garrow J. S., James W. P. T.,) tr. 53).

Trong thức ăn chăn nuôi, hemixenluloza và xenluloza (bao gồm arabinoxylan không tan) cũng tạo thành các rào cản vật lý bao bọc lấy (hay giữ chặt) các chất dinh dưỡng như tinh bột và protein và do đó chặn đường tiếp cận của động vật đến các chất dinh dưỡng này.

Hemixenluloza và xenluloza (bao gồm arabinoxylan không tan (AXinsol)) tự chúng cũng là nguồn năng lượng tiềm tàng, do chứa sacarit C5 và C6. Mono sacarit C6 có thể được sử dụng làm nguồn năng lượng cho động vật, trong khi oligo sacarit C5 có thể được biến nạp thành các axit béo mạch ngắn bởi vi thực vật có mặt trong ruột động vật (van den Broek và cộng sự, 2008 Molecular Nutrition & Food Research (Nghiên cứu Thực phẩm & Dinh dưỡng phân tử 2008), 52, 146-63), các axit béo mạch ngắn này có thể được ruột động vật hút và tiêu hóa.

Việc giải phóng các chất dinh dưỡng và nước từ thức ăn chăn nuôi do sự phân giải rào cản vật lý phụ thuộc vào khả năng của xylanaza trong việc phân giải thành phần chất xơ không tan (ví dụ, arabinoxylan không tan (AXinsol)).

Sáng chế đề xuất enzyme trong đó enzyme là xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza, trong đó enzyme này hoặc phân đoạn của nó được tăng cường độ ổn định nhiệt so với enzyme xylanaza GH10 gốc, enzyme xylanaza GH10 gốc đã được cải biến tại, ít nhất, hai trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Sáng chế còn đề xuất enzyme trong đó enzyme là xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza, trong đó enzyme hoặc phân đoạn của nó có độ ổn định nhiệt được tăng cường so với enzyme xylanaza GH10 gốc, enzyme xylanaza GH10 gốc đã được cải biến tại, ít nhất, ba trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Sáng chế đề xuất enzyme trong đó enzyme là xylanaza GH10 hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza, trong đó enzyme hoặc phân đoạn của nó có độ ổn định nhiệt được tăng cường so với enzyme xylanaza GH10 gốc, enzyme xylanaza GH10 gốc đã được cải biến tại, ít nhất, các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể bao gồm ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các cải biến sau đây:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L hoặc M;

A217Q, E, P, D hoặc M; và

T298Y, F hoặc W.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các vị trí được chỉ thị:

7D;

33V;

79Y, V, F, I, L hoặc M;

217Q, E, P, D hoặc M; và

298Y, F hoặc W.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các cải biến sau:

N7D;

T33V;

K79Y, F hoặc V;

A217Q, E hoặc P; và

T298Y hoặc F.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các vị trí được chỉ thị:

7D;

33V;

79Y, F hoặc V;

217Q, E hoặc P; và

298Y hoặc F.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các cải biến sau:

N7D;
 T33V;
 K79Y;
 A217Q; và
 T298Y.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba) trong số các vị trí được chỉ thị:

7D;
 33V;
 79Y;
 217Q; và
 298Y.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm ít nhất các cải biến sau:

N7D;
 T33V;
 K79Y, V, F, I, L hoặc M;
 A217Q, E, P, D hoặc M; và
 T298Y, F hoặc W.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, bao gồm các axit amin sau tại các vị trí được chỉ thị:

7D;
 33V;
 79Y, V, F, I, L hoặc M;
 217Q, E, P, D hoặc M; và
 298Y, F hoặc W.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm ít nhất các cải biến sau:

N7D;
 T33V;
 K79Y, F hoặc V;

A217Q, E hoặc P; và
T298Y hoặc F.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, bao gồm các axit amin sau tại các vị trí được chỉ thị:

7D;
33V;
79Y, F hoặc V;
217Q, E hoặc P; và
298Y hoặc F.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm ít nhất các cải biến sau:

N7D;
T33V;
K79Y;
A217Q; và
T298Y.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, bao gồm các axit amin sau tại các vị trí được chỉ thị:

7D;
33V;
79Y;
217Q; và
298Y.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất một trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất hai trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất ba trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất bốn trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất năm trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất bảy trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Theo một phương án, ngoài việc được cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế có thể còn được cải biến thêm tại ít nhất chín trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 25, cải biến có thể tại N25P. Nói cách khác, axit amin tại gốc 25 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là P.

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 57, cải biến có thể được chọn từ S57Q, T hoặc V (tốt nhất là Q). Nói cách khác, axit amin tại gốc 57 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là Q, T hoặc V (tốt nhất là Q).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 62, cải biến có thể được chọn từ N62T hoặc S (tốt nhất là T). Nói cách khác, axit amin tại gốc 62 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là T hoặc S (tốt nhất là T).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 64, cải biến có thể được chọn từ G64T hoặc S (tốt nhất là T). Nói cách khác, axit amin tại gốc 64 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là T hoặc S (tốt nhất là T).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 89, cải biến có thể được chọn từ S89G, N, Q, L hoặc M (tốt hơn là G hoặc Q, tốt hơn nữa là G). Nói

cách khác, axit amin tại gốc 89 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là G, N, Q, L hoặc M (tốt hơn là G hoặc Q, tốt hơn nữa là G).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 103, cải biến có thể được chọn từ T103M hoặc K (tốt nhất là M). Nói cách khác, axit amin tại gốc 103 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là M hoặc K (tốt nhất là M).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 115, cải biến có thể được chọn từ V115E hoặc L (tốt nhất là L). Nói cách khác, axit amin tại gốc 115 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là E hoặc L (tốt nhất là L).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 147, cải biến có thể tại N147Q. Nói cách khác, axit amin tại gốc 147 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là Q.

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 181, cải biến có thể được chọn từ G181Q, A, D hoặc P (tốt nhất là Q). Nói cách khác, axit amin tại gốc 181 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là Q, A, D hoặc P (tốt nhất là Q).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 193, cải biến có thể được chọn từ S193Y hoặc N (tốt nhất là Y). Nói cách khác, axit amin tại gốc 193 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là 193Y hoặc N (tốt nhất là Y).

Khi enzym xylanaza cải biến còn được cải biến thêm tại vị trí 219, cải biến có thể được chọn từ G219D hoặc P (tốt nhất là P). Nói cách khác, axit amin tại gốc 219 của xylanaza GH10 của sáng chế tốt nhất là D hoặc P (tốt nhất là P).

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế ngoài việc bao gồm các cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, còn bao gồm các cải biến trong các gốc sau: 25 và 89 (tốt nhất là N25P và S89G).

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế ngoài việc bao gồm các cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, còn bao gồm các cải biến trong các gốc sau: 57, 62, 64 và 89 (tốt nhất là S57Q, N62T, G64T và S89G).

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế ngoài việc bao gồm các cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, còn bao gồm các cải biến trong các gốc sau: 25, 57, 62, 64, 103, 115, 147, 181, 193 và 219 (tốt nhất là N25P, S57Q, N62T, G64T, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y và G219P).

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế ngoài việc bao gồm các cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, còn bao gồm các cải biến trong các gốc sau: 25, 57, 62, 89, 103, 115, 147, 181, 193 và 219 (tốt nhất là N25P, S57Q, N62T, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, G219P và T298Y).

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến theo sáng chế ngoài việc bao gồm các cải biến tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, còn bao gồm các cải biến trong các gốc sau: 25, 89 và 64 (tốt nhất là N25P, S89G, G64T)

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến (hay xylanaza GH10) theo sáng chế có thể bao gồm các axit amin sau tại các vị trí được chỉ thị:

- a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;
- b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;
- c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P và 298Y;
- d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P và 298Y;
- e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;
- f. 79F_217Q_ và 298F;
- g. 7D,_33V,_217Q_ và 298F;
- h. 7D,_79F và 298F;
- i. 33V, 79F và _217Q;
- j. 7D, 33V và _298Y;
- k. 33V,_217Q_ và 298Y;
- l. 7D,_217Q và _298F;
- m. 7D,_33V và 217Q;
- n. 79F và 298F;
- o. 7D và 79F;
- p. 33V_ và 79F;
- q. 33V và _298Y;
- r. 7D_ và 33V; hoặc
- s. 33V và _A217Q.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến (hay xylanaza GH10) theo sáng chế có thể bao gồm các axit amin sau tại các vị trí được chỉ thị:

- a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;
- b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;
- c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P và 298Y;
- d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P và 298Y;
- e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q và 298Y;

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến (hay xylanaza GH10) theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến sau:

- a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- f. K79F_A217Q_T298F;
- g. N7D_T33V_A217Q_T298F;
- h. N7D_K79F_T298F;
- i. T33V_K79F_A217Q;
- j. N7D_T33V_T298Y;
- k. T33V_A217Q_T298Y;
- l. N7D_A217Q_T298F;
- m. N7D_T33V_A217Q;
- n. K79F_T298F;
- o. N7D_K79F;
- p. T33V_K79F;
- q. T33V_T298Y;
- r. N7D_T33V; hoặc
- s. T33V_A217Q.

Theo một phương án, enzym xylanaza cải biến (hay xylanaza GH10) theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến sau:

- a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;

Theo một phương án, enzym xylanaza theo sáng chế (ví dụ, enzym xylanaza cải biến) có trình tự axit amin khung (trước khi cải biến) bao gồm (hoặc gồm có) trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5; hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, SỐ ID TRÌNH TỰ 5; hoặc trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được lai hóa thành SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33 trong các điều kiện cực kỳ nghiêm ngặt.

Thuật ngữ "mẹ" có nghĩa là xylanaza, tốt nhất là xylanaza GH10, được thực hiện biến đổi để tạo ra enzym cải biến của sáng chế. Theo một phương án, enzym mẹ là xylanaza GH10. Enzym mẹ có thể phù hợp là một polypeptit xuất hiện một cách tự

nhiên (kiểu đại) hoặc biến thể hoặc phân đoạn của nó. Theo một phương án ưu tiên, enzym mẹ xuất hiện một cách tự nhiên (polypeptit kiểu đại).

Xylanaza cải biến hoặc xylanaza GH10 theo sáng chế có thể bao gồm (hay gồm có, hay chủ yếu gồm có) trình tự axit amin đồng nhất hoặc cơ bản đồng nhất với enzym mẹ đã nêu trừ cải biến ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) vị trí trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Trong một số phương án, xylanaza cải biến hoặc xylanaza GH10 theo sáng chế bao gồm (hay gồm có, hay chủ yếu gồm có) trình tự axit amin đồng nhất hoặc cơ bản đồng nhất với enzym mẹ đã nêu trừ cải biến ở ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất năm) vị trí trong số các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298, cũng như tại ít nhất một trong số các vị trí 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Xylanaza GH10 cải biến hoặc xylanaza GH10 theo sáng chế (và ví dụ như được yêu cầu bảo hộ trong điểm 1) có khoảng ít nhất 90% (tốt nhất là ít nhất 93%, tốt nhất là ít nhất 97%, tốt nhất là ít nhất 99%) trình tự đồng nhất với enzym mẹ là phù hợp.

Thuật ngữ "khung" như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là chuỗi polypeptit là polypeptit xylanaza GH10, được cải biến để bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt nhất là tại ít nhất ba, tốt nhất là tại tất cả) vị trí trong số các vị trí được chỉ thị: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L hoặc M (tốt hơn là 79Y, F hoặc V, tốt hơn nữa là Y); 217Q, E, P, D hoặc M (tốt hơn là 217Q, E hoặc P, tốt hơn nữa là Q); và 298Y, F hoặc W (tốt hơn là Y hoặc F, tốt hơn nữa là Y) trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 của sáng chế (ví dụ enzym xylanaza GH10 cải biến) tốt nhất bao gồm polypeptit có 70% (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) đồng nhất với xylanaza GH10 (ví dụ xylanaza GH10 gốc hoặc xylanaza GH10 khung); và bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là tất cả) vị trí trong số các vị trí được chỉ thị: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L hoặc M (tốt hơn là 79Y, F hoặc V, tốt hơn nữa là Y); 217Q, E, P, D hoặc M (tốt hơn là 217Q, E hoặc P, tốt hơn nữa là Q); và 298Y, F hoặc W (tốt hơn là Y hoặc F, tốt hơn nữa là Y) trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 của sáng chế (ví dụ enzym xylanaza GH10 cải biến) tốt nhất bao gồm polypeptit có ít nhất 95% (ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) đồng nhất với xylanaza GH10 (ví dụ xylanaza GH10 gốc hoặc xylanaza GH10 khung); và bao gồm các axit amin sau tại ít nhất hai (tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là tất cả) vị trí trong số các vị trí được chỉ thị: 7D, 33V, 79Y, 217Q); và 298Y, trong đó việc đánh số dựa theo cách đánh số axit amin của FveXyn4 (SỐ ID TRÌNH TỰ 1).

Theo một phương án, xylanaza GH10 gốc hoặc xylanaza GH10 khung (trước khi cải biến) là:

- a. xylanaza bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5; hoặc
- b. enzym xylanaza bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5; hoặc
- c. enzym xylanaza được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc
- d. enzym xylanaza được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 70% đồng nhất (ít nhất 80% là phù hợp, ít nhất 90% là phù hợp, ít nhất 95% là phù hợp, ít nhất 98% là phù hợp, ít nhất 99% là phù hợp) với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33; hoặc
- e. enzym xylanaza được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được lai hóa thành SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ

25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33 trong các điều kiện cực kỳ nghiêm ngặt;

Theo một phương án, trình tự axit amin khung hoặc trình tự axit amin mẹ có ít nhất 80% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5.

Theo một phương án, trình tự axit amin khung hoặc trình tự axit amin mẹ có ít nhất 90% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5.

Theo một phương án, trình tự axit amin khung hoặc trình tự axit amin mẹ có ít nhất 95% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5.

Theo một phương án, trình tự axit amin khung hoặc trình tự axit amin mẹ có ít nhất 98% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 1, SỐ ID TRÌNH TỰ 26, SỐ ID TRÌNH TỰ 27, SỐ ID TRÌNH TỰ 3, SỐ ID TRÌNH TỰ 28, SỐ ID TRÌNH TỰ 29, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 5.

Theo một phương án, enzym xylanaza khung hoặc enzym xylanaza mẹ có thể được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 80% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33.

Theo một phương án, enzym xylanaza khung hoặc enzym xylanaza mẹ có thể được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 90% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33.

Theo một phương án, enzym xylanaza khung hoặc enzym xylanaza mẹ có thể được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 95% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33.

Theo một phương án, enzym xylanaza khung hoặc enzym xylanaza mẹ có thể được mã hóa bởi trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 98% đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ 2, SỐ ID TRÌNH TỰ 24, SỐ ID TRÌNH TỰ 25, SỐ ID TRÌNH

TỰ 4, SỐ ID TRÌNH TỰ 30, SỐ ID TRÌNH TỰ 31, SỐ ID TRÌNH TỰ 6, SỐ ID TRÌNH TỰ 32 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 33.

Có thể thu được (một cách phù hợp) xylanaza GH10 khung hoặc xylanaza GH10 gốc từ sinh vật *Fusarium*.

Xylanaza khung hoặc xylanaza mẹ phù hợp là endo-1,4- β -d-xylanaza.

Xylanaza cải biến hay xylanaza GH10 theo sáng chế tốt nhất là endo-1,4- β -d-xylanaza.

Theo một phương án ưu tiên, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có giá trị T_m lớn hơn 70°C (tốt nhất là lớn hơn 75°C), trong đó giá trị T_m được đo là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ.

Độ bền nhiệt của xylanaza (ví dụ xylanaza cải biến) theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng "Xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt" (xem phần dưới).

Xác định đo độ bền nhiệt

Mức độ cải biến do nhiệt của các biến thể FveXyn4 được đo bằng cách pha loãng và ủ trước các mẫu enzym trong dung dịch đệm MES 25 mM, pH 6,0 trong 10 phút ở các nhiệt độ khác nhau (lần lượt là 66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76, 76,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6, và 85°C) và sau đó đo hoạt tính còn lại bằng phương pháp hoạt tính xylanaza được mô tả trong Ví dụ 1. Hoạt tính đo được mà không ủ trước được đặt là 100% và hoạt tính còn lại của từng biến thể ở mỗi mức nhiệt độ được tính tương quan với hoạt tính này. Giá trị T_m được tính theo các mức độ cải biến do nhiệt, là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại.

Theo một phương án, enzym sẽ được coi là bền nhiệt theo sáng chế nếu nó có giá trị T_m cao hơn 70°C, trong đó giá trị T_m là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ. Giá trị T_m này có thể được đo theo xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt như đã được đề cập trong bản mô tả này.

Theo một phương án, enzym sẽ được coi là bền nhiệt theo sáng chế nếu nó có giá trị T_m cao hơn 76°C, trong đó giá trị T_m là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ. Giá trị T_m này có thể được đo theo xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt như đã được đề cập trong bản mô tả này.

Theo một phương án, enzym sẽ được coi là bền nhiệt theo sáng chế nếu nó có giá trị T_m cao hơn 85°C, trong đó giá trị T_m là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu

được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ. Giá trị T_m này có thể được đo theo xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt như đã được đề cập trong bản mô tả này.

Tốt nhất là, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym này) có thể chịu được quy trình xử lý nhiệt (ví dụ trong quy trình tạo viên) lên tới khoảng 70°C; ví dụ lên đến 75°C, ví dụ lên đến 76°C, ví dụ lên đến khoảng 85°C; hoặc ví dụ lên đến khoảng 95°C. Quy trình xử lý nhiệt có thể được thực hiện trong khoảng thời gian lên đến khoảng 1 phút; lên đến khoảng 5 phút; lên đến khoảng 10 phút; lên đến khoảng 30 phút; lên đến khoảng 60 phút. Chịu được quy trình xử lý nhiệt này nghĩa là ít nhất 50% enzym có mặt/hoạt động trong chất phụ gia trước khi đun nóng tới nhiệt độ quy định vẫn có mặt/hoạt động sau khi chất này được để nguội đến nhiệt độ phòng. Tốt nhất là, ít nhất khoảng 80% enzym có mặt và hoạt động trong chất phụ gia trước khi đun nóng đến nhiệt độ quy định vẫn có mặt và hoạt động sau khi chất này được để nguội đến nhiệt độ phòng.

Thuật ngữ "độ ổn định nhiệt" là khả năng của enzym kháng lại sự mất hoạt tính không thuận nghịch (thường do cải biến) ở nhiệt độ tương đối cao. Điều này có nghĩa là enzym giữ lại một lượng xác định hoạt tính men sau khi ở trong môi trường nhiệt độ xác định trong một khoảng thời gian đã cho.

Có rất nhiều cách để đo độ ổn định nhiệt. Ví dụ, các mẫu enzym có thể được ủ không có cơ chất trong một khoảng thời gian xác định (ví dụ 10 phút hoặc 1 đến 30 phút) trong môi trường nhiệt độ cao so với nhiệt độ mà tại mức nhiệt này enzym ổn định trong khoảng thời gian lâu hơn (ngày). Sau khi ủ ở nhiệt độ cao, mẫu enzym được phân tích hoạt tính còn lại ở nhiệt độ cho phép, ví dụ, là 30°C (hoặc 25-50°C hoặc kể cả lên đến 70°C). Hoạt tính còn lại được tính theo mẫu enzym chưa được ủ ở nhiệt độ cao.

Độ bền nhiệt cũng có thể được đo bằng sự mất hoạt tính enzym theo hàm nhiệt độ. Ở đây các mẫu enzym được ủ không có cơ chất trong một khoảng thời gian xác định (ví dụ 10 phút hoặc 1 đến 30 phút) ở các nhiệt độ khác nhau và sau đó kết quả ủ được phân tích hoạt tính còn lại ở nhiệt độ cho phép là 30°C (hoặc 25-70°C hoặc kể cả cao hơn). Hoạt tính còn lại ở từng nhiệt độ được tính toán theo mẫu enzym chưa được ủ ở nhiệt độ cao. Mức cải biến do nhiệt (nhiệt độ đối với hoạt tính còn lại) có thể được sử dụng để tính nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ đó thu được 50% hoạt tính còn lại. Giá trị này được định nghĩa là giá trị T_m .

Hơn nữa, độ ổn định nhiệt cũng có thể được đo bằng sự mất hoạt tính enzym theo hàm thời gian. Ở đây các mẫu enzym được ủ không có cơ chất tại nhiệt độ cao xác định (ví dụ 76°C) trong các khoảng thời gian khác nhau (ví dụ trong khoảng giữa 10 giây và 30 phút) và sau đó kết quả ủ được phân tích hoạt tính còn lại ở nhiệt độ cho phép là 30°C (hoặc 25-70°C hoặc kể cả cao hơn). Hoạt tính còn lại ở từng nhiệt độ được tính toán theo mẫu enzym chưa được ủ ở nhiệt độ cao. Mức độ mất hoạt tính (thời gian đối với hoạt tính còn lại) có thể được sử dụng để tính khoảng thời gian trong đó thu được 50% hoạt tính còn lại. T1/2 là giá trị thường được cho.

Đây là các ví dụ về cách đo độ ổn định nhiệt. Độ bền nhiệt có thể được đo bằng các phương pháp khác. Tốt nhất độ ổn định nhiệt được đánh giá bằng cách sử dụng "Xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt" như đã được đề cập trong bản mô tả này.

Khác với độ ổn định nhiệt, hoạt hóa nhiệt là hoạt tính enzym theo hàm nhiệt độ. Để xác định hoạt hóa nhiệt, các mẫu enzym có thể được ủ (xét nghiệm) trong khoảng thời gian được xác định bởi xét nghiệm ở nhiều nhiệt độ khác nhau với sự có mặt của cơ chất. Hoạt tính enzym thu được trong hoặc ngay sau khi ủ như được xác định bởi xét nghiệm (ví dụ, đọc trị số OD chỉ lượng sản phẩm phản ứng được tạo thành). Nhiệt độ đạt được hoạt tính cao nhất là nhiệt độ tối ưu của enzym trong các điều kiện xét nghiệm đã cho. Hoạt tính thu được ở mỗi nhiệt độ có thể được tính theo hoạt tính thu được ở nhiệt độ tối ưu. Theo đó, sẽ cung cấp mức nhiệt độ cho enzym trong các điều kiện xét nghiệm đã cho.

Trong đơn xin cấp bằng sáng chế này, độ ổn định nhiệt không giống như hoạt hóa nhiệt.

Sẽ là hợp lý khi xylanaza cải biến theo sáng chế có độ pH tối ưu nằm trong khoảng 4,6 đến 7, tốt nhất khoảng 5 đến 6.

Theo một phương án ưu tiên, xylanaza cải biến theo sáng chế bao gồm một trong số các trình tự axit amin được nêu trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20, SỐ ID TRÌNH TỰ 21, hoặc phân đoạn của nó có hoạt tính xylanaza.

Theo một phương án, các cải biến trong trình tự polynucleotit khung là các cải biến phù hợp để mang lại các cải biến như đề cập chi tiết ở phần trên trong trình tự axit amin được mã hóa.

Các phương pháp của sáng chế cũng phù hợp để mang lại các cải biến như đã đề cập ở phần trên trong trình tự polynucleotit hoặc trình tự axit amin.

Tế bào chủ của sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào nấm dạng sợi và tế bào thực vật. Tốt nhất tế bào chủ là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm.

Theo một phương án ưu tiên, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế được sản xuất theo phương pháp của sáng chế, được thu hồi.

Theo một phương án ưu tiên, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế được sản xuất theo phương pháp của sáng chế, được phân lập và/hoặc tinh chế.

Trong một số phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể được sử dụng trực tiếp làm sản phẩm lên men mà không cần phân lập và/hoặc tinh chế enzym.

Trong một số phương án, chế phẩm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế hoặc hỗn hợp sơ chế theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62) hoặc bacillolysin (E.C. 3.4.24.28) hoặc serin proteaza kiềm (E.C. 3.4.21.x) hoặc keratinase (E.C. 3.4.x.x)) và/hoặc amylaza (bao gồm α -amylaza (E.C. 3.2.1.1), amylaza tạo G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amylaza (E.C. 3.2.1.2) và γ -amylaza (E.C. 3.2.1.3)).

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể được sử dụng trong phương pháp phân giải nguyên liệu chứa arabinoxylan trong nguyên liệu chứa xylan.

Arabinoxylan phù hợp có thể là arabinoxylan không tan (AXinsol).

Theo một phương án, nguyên liệu chứa xylan được chọn từ một hay nhiều loại từ nhóm bao gồm: thức ăn gia súc hay thức ăn chăn nuôi; thành phần thức ăn chăn nuôi; nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc; dịch ngâm, dịch đường, mạch nha; lúa mạch chứa mạch nha; chất phụ gia; dịch ngâm lúa mạch; và bột ngũ cốc.

Theo một phương án ưu tiên, arabinoxylan được hòa tan mà không làm tăng độ nhớt trong môi trường phản ứng.

Theo một phương án của sáng chế, thức ăn chăn nuôi hay thành phần thức ăn chăn nuôi bao gồm hay gồm có ngô, DDGS (như DDGS ngô), lúa mì, cám lúa mì hoặc kết hợp các thành phần này.

Theo một phương án ưu tiên, thức ăn chăn nuôi là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62) hoặc bacillolysin (E.C. 3.4.24.28) hoặc serin proteaza kiềm (E.C. 3.4.21.x) hoặc keratinase (E.C. 3.4.x.x)) và/hoặc amylaza (bao gồm α -amylaza (E.C. 3.2.1.1), amylaza tạo G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amylaza (E.C. 3.2.1.2) và γ -amylaza (E.C. 3.2.1.3)).

Theo một phương án, phương pháp hoặc việc sử dụng theo sáng chế bao gồm bước cho đối tượng sử dụng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, hoặc sản phẩm lên men chứa enzym này theo sáng chế, hoặc chế phẩm enzym chứa enzym xylanaza này theo sáng chế, hoặc chế phẩm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa enzym xylanaza này theo sáng chế, hoặc hỗn hợp sơ chế chứa enzym xylanaza này theo sáng chế hoặc thức ăn chăn nuôi chứa enzym xylanaza này theo sáng chế.

Theo một phương án, phương pháp hoặc việc sử dụng của sáng chế là (hoặc là một phần của) quy trình tách gluten-tinh bột lúa mì.

Theo một phương án khác, phương pháp hoặc việc sử dụng của sáng chế là (hoặc là một phần của) quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học) hay chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học).

Theo một phương án khác, phương pháp hoặc việc sử dụng của sáng chế là (hoặc là một phần của) quy trình nấu rượu bia hay tạo mạch nha.

Đồ uống lên men, ví dụ như bia, có thể được sản xuất một cách phù hợp bằng phương pháp theo sáng chế như đã được dự kiến trong sáng chế.

Theo một phương án, enzym xylanaza mẹ của sáng chế sau đây có thể được gọi là FveXyn4.

Cả trình tự chuỗi polypeptit và trình tự axit nucleic đề cập trong bản mô tả này tốt nhất là được phân lập.

Xylanaza của sáng chế tốt nhất là xylanaza GH10. Nói cách khác, xylanaza có thể có khối lượng phân tử nằm trong khoảng 32-39 kDa, và/hoặc miền xúc tác của xylanaza bao gồm cấu trúc barrel β/α 8 vòng (được đề cập trong Harris và cộng sự, 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D (Tạp chí Tinh thể học Phần D) 52, 393-401).

Theo một phương án của sáng chế, xylanaza của sáng chế là xylanaza thuộc họ Glycosit Hydrolaza (GH) 10. Thuật ngữ "thuộc họ Glycosit Hydrolaza (GH) 10" có nghĩa rằng xylanaza đang được đề cập chính là hoặc có thể được phân loại trong họ GH 10.

Các nghiên cứu về sự tương đồng protein (ví dụ giải thuật blast protein tại http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) có thể xác định liệu một trình tự chưa xác định có rơi vào đoạn có thành phần thuộc họ xylanaza GH10 hay không, cụ thể là các họ GH có thể được phân loại dựa trên sự tương đồng trình tự trong các vùng chính. Ngoài ra, hay hoặc là, để xác định liệu protein chưa được xác định có phải là protein xylanaza thuộc họ GH10 hay không, cần phải thực hiện đánh giá, không chỉ về sự đồng dạng/tương đồng/đồng nhất trình tự, mà còn về sự đồng dạng của cấu trúc 3D. Sự phân loại các họ GH thường dựa trên cuộn gấp 3D. Phần mềm sẽ dự đoán cuộn gấp 3D của trình tự protein chưa xác định là HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Điểm mạnh của phần mềm này trong việc dự đoán cấu trúc protein nằm ở chỗ phần mềm nhận diện được các trình tự tương đồng với cấu trúc đã biết được sử dụng làm mẫu. Phần mềm này làm việc rất tốt bởi vì các cấu trúc phân kỳ chậm hơn rất nhiều so với các trình tự bậc một. Các protein cùng họ có thể có các cấu trúc rất giống nhau ngay cả khi các trình tự của chúng phân kỳ đến mức khó nhận dạng.

Trong thực hành, trình tự chưa xác định có thể được gán vào phần mềm (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) trong định dạng FASTA. Sau khi thực hiện xong việc này thì nghiên cứu có thể được gửi đi. Kết quả của nghiên cứu sẽ hiển thị danh sách các trình tự có cấu trúc 3D đã biết. Để xác nhận trình tự chưa được xác định thực sự là xylanaza GH10, có thể tìm xylanaza GH10 trong danh sách các chất đồng đẳng có xác suất > 90. Không phải tất cả các protein được nhận dạng là chất đồng đẳng đều có đặc trưng của xylanaza GH10, nhưng một số protein thì có. Các protein sau là các protein có cấu trúc đã biết và có đặc trưng sinh hóa học nhận dạng chúng là xylanaza. Các protein trước không có đặc trưng sinh hóa học là xylanaza GH10. Một số tài liệu tham chiếu mô tả quy trình này là Söding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison - Bioinformatics (Phát hiện sự tương đồng protein bằng cách so sánh HMM-HMM - Tin sinh học) 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125) và Söding J, Biegert A, và Lupas AN. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction -

Nucleic Acids Research (Máy chủ tương tác HHpred để phát hiện tương đồng protein và dự đoán cấu trúc - Nghiên cứu axit nucleic) 33, W244--W248 (Máy chủ web phát hành) (doi:10.1093/nar/gki40).

Theo trang Cazy (<http://www.cazy.org/>), họ glycosit hydrolaza 10 có thể có đặc trưng như sau:

Hoạt tính đã biết: endo-1,4- β -xylanaza (EC 3.2.1.8); endo-1,3- β -xylanaza (EC 3.2.1.32); tomatinase (EC 3.2.1.-)

Cơ chế: Giữ lại

Họ: GH-A

Ái nhân xúc tác/Bazơ: Glu (thử nghiệm)

Chất cho proton xúc tác: Glu (thử nghiệm)

Trạng thái cấu trúc 3D: (β / α)₈

Xylanaza GH10 của sáng chế có thể có miền xúc tác có khối lượng phân tử nằm trong khoảng 32-39 kDa. Cấu trúc của miền xúc tác của xylanaza GH10 của sáng chế bao gồm barrel β/α 8 vòng (Harris và cộng sự, 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D (Tập chí Tinh thể học Phần D) 52, 393-401).

Một số lượng lớn các enzyme họ GH10 có cấu trúc 3 chiều, được phân giải trước tiên là các cấu trúc của xylanaza A của *Streptomyces lividans* (Derewenda và cộng sự J Biol Chem (Tập chí Sinh hóa học), 19/08/1994; 269(33) 20811-4), endo-glycanase Cex của *C. fimi* (White và cộng sự, Biochemistry (Sinh hóa học), 25/10/1994; 33(42) 12546-52), và Xyn10A của *Cellvibrio japonicus* (trước đây là phân loài xylanaza A của *Pseudomonas fluorescens*) (Harris và cộng sự, Structure (Cấu trúc), 15/11/1994; 2(11) 1107-16.). Là thành viên của họ GHA, chúng có cuộn gấp TIM barrel (α/β)₈ kiểu cổ điển với các axit glutamic ở hai điểm hoạt hóa chính nằm tại đầu C của sợi beta 4 (axit/bazơ) và 7 (ái nhân) (Henrissat và cộng sự, Proc Natl Acad Sci U S A (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ), 18/07/1995; 92(15) 7090-4).

Thuật ngữ "xylanaza GH10" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ polypeptit có hoạt tính xylanaza và có cuộn gấp TIM barrel (α/β)₈ cổ điển với các axit glutamic ở hai điểm hoạt hóa chính nằm tại đầu C của sợi beta 4 (axit/bazơ) và 7 (ái nhân).

Trong bản mô tả này, enzyme xylanaza khung (hay mẹ) có thể chỉ FveXyn4 hoặc FoxXyn 2 (các thuật ngữ này chỉ các protein hoạt hóa, ví dụ protein trưởng thành).

Theo một phương án, tốt nhất xylanaza là xylanaza nấm.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, và/hoặc enzym mẹ là xylanaza GH10.

Theo một phương án, tốt nhất là enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, (và/hoặc xylanaza mẹ) là xylanaza GH10 nấm.

Theo một phương án, tốt nhất là enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, (và/hoặc xylanaza mẹ) là endoxylanaza, ví dụ, endo-1,4- β -d-xylanaza. Phân loại endo-1,4- β -d-xylanaza là E.C. 3.2.1.8.

Trong một số phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có độ pH tối ưu bằng khoảng 6.

Tốt nhất là, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, giữ lại hơn 70% hoạt tính tối đa với độ pH nằm trong khoảng giữa pH 4 và 8, giữa pH 4,6 và 7 là phù hợp.

Trong một số phương án, ví dụ trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, tốt nhất là giữ lại hơn 70% hoạt tính tối đa với độ pH nằm trong khoảng giữa pH 5,1 và 7.

Không bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết nào, độ pH cũng có thể có tác động quan trọng lên tính hữu hiệu và tính hiệu quả của enzym. Cụ thể trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi, mức pH của xylanaza của sáng chế hỗ trợ hoạt tính trong ruột non, trong các điều kiện trung hòa.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có khả năng phân giải (hoặc phân giải) nguyên liệu chứa xylan, cụ thể là các arabinoxylan, cụ thể là arabinoxylan không tan (AXinsol).

Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có khả năng phân giải (hoặc phân giải) polyme tan (ví dụ oligome) được sản sinh từ sự phân giải AXinsol hoặc có mặt (một cách tự nhiên) trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc.

Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, có khả năng phân giải (hoặc phân giải) cả nguyên liệu chứa xylan, cụ thể là các arabinoxylan, cụ thể là AXinsol, và polyme tan (ví dụ oligome) được sản sinh từ sự phân giải AXinsol.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế, không bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế xylanaza lúa mì, ví dụ các chất ức chế protein, ví dụ các chất ức chế protein giống TAXI trong lúa mì. Các xylanaza nằm trong kỹ thuật trước đây có thể bị ức chế lên tới 70-95% bởi các chất ức chế protein lúa mì. Tốt nhất là các xylanaza của sáng chế chỉ bị ức chế ở mức tối đa là 20-30% trong hầu hết các ứng dụng về lúa mì.

TAXI là các chất ức chế xylanaza *Triticum aestivum*, có mặt trong ngũ cốc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bao gồm chủ yếu" có nghĩa là các thành phần không xác định có thể có mặt trong điều kiện các đặc điểm của chế phẩm yêu cầu bảo hộ không bị ảnh hưởng đáng kể.

Thuật ngữ "gồm có" nghĩa là tỷ lệ của các thành phần cụ thể phải là tổng 100%.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bao gồm" có thể được sửa đổi trong một số phương án để chỉ bao gồm chủ yếu hay gồm có (cả hai đều có nghĩa hạn chế hơn "bao gồm").

Theo một phương án, arabinoxylan không tan chứa nguyên liệu không phải là rom lúa mì.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân đoạn của nó" chỉ phân đoạn hoạt hóa. Nói cách khác, phân đoạn là phân đoạn có hoạt tính xylanaza. Phân đoạn có thể, một cách phù hợp, có cùng hoạt tính xylanaza giống như toàn bộ enzym xylanaza GH10 cải biến đầy đủ chiều dài mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó. Hoặc, phân đoạn có thể có hoạt tính cải biến (ví dụ, hoạt tính đặc hiệu, độ pH, đường cong nhiệt độ hoặc tính đặc hiệu được tăng cường) so với enzym xylanaza GH10 cải biến đầy đủ chiều dài mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó. Ngoài ra, phân đoạn phải giữ lại được các tính chất bền nhiệt của enzym xylanaza GH10 cải biến mà nó là phân đoạn từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn bằng ít nhất 60% toàn bộ chiều dài của enzym xylanaza GH10 cải biến mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn bằng ít nhất 75% toàn bộ chiều dài của enzym xylanaza GH10 cải biến mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn bằng ít nhất 85% toàn bộ chiều dài của enzym xylanaza GH10 cải biến mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn bằng ít nhất 95% toàn bộ chiều dài của enzym xylanaza GH10 cải biến mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn bằng ít nhất 98% toàn bộ chiều dài của enzym xylanaza GH10 cải biến mà phân đoạn có nguồn gốc từ đó.

Theo một phương án, phân đoạn là phân đoạn của ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế a) bao gồm một trong số các trình tự axit amin được nêu trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20, SỐ ID TRÌNH TỰ 21, hoặc b) bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 96%, tốt nhất là ít nhất 98,5%, đồng nhất với các trình tự axit amin được nêu trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20, SỐ ID TRÌNH TỰ 21 sao cho các axit amin ở các vị trí 7, 33, 79, 217 và 298 đồng nhất với các axit amin có trong SỐ ID TRÌNH TỰ 17, SỐ ID TRÌNH TỰ 18, SỐ ID TRÌNH TỰ 19, SỐ ID TRÌNH TỰ 20, hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic theo sáng chế hoặc vector hoặc cấu trúc chứa phân tử này, trong đó trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: SỐ ID TRÌNH TỰ 7, SỐ ID TRÌNH TỰ 8, SỐ ID TRÌNH TỰ 9, SỐ ID TRÌNH TỰ 10, SỐ ID TRÌNH TỰ 11, SỐ ID TRÌNH TỰ 12, SỐ ID TRÌNH TỰ 13, SỐ ID TRÌNH TỰ 14, SỐ ID TRÌNH TỰ 15 và SỐ ID TRÌNH TỰ 16; hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 96%, tốt nhất là 98,5%, đồng nhất với các trình tự nucleotit được nêu trong bản mô tả này có SỐ ID TRÌNH TỰ 7, SỐ ID TRÌNH TỰ 8, SỐ ID TRÌNH TỰ 9, SỐ ID TRÌNH TỰ 10, SỐ ID TRÌNH TỰ 11, SỐ ID TRÌNH TỰ 12, SỐ ID TRÌNH TỰ 13, SỐ ID TRÌNH TỰ 14, SỐ ID TRÌNH TỰ 15 và SỐ ID TRÌNH TỰ 16 sao cho các codon mã hóa các vị trí axit amin 7, 33, 79, 217 và 298 trong protein trưởng thành cũng giống như trong SỐ ID TRÌNH TỰ 7, SỐ ID TRÌNH TỰ 8, SỐ ID TRÌNH TỰ 9, SỐ ID TRÌNH TỰ 10, SỐ ID TRÌNH TỰ 11, SỐ ID TRÌNH TỰ 12, SỐ ID TRÌNH TỰ 13, SỐ ID TRÌNH TỰ 14, SỐ ID TRÌNH TỰ 15 hoặc SỐ ID TRÌNH TỰ 16.

Thuật ngữ "cải biến", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là thay đổi hoặc biến đổi. Cụ thể, thuật ngữ "cải biến", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là thay đổi so với dạng xuất hiện một cách tự nhiên. Nói cách khác, khi cải biến enzym, người ta làm thay đổi enzym theo phương thức khiến cho enzym thay đổi so với enzym khung mẹ. Tốt nhất là enzym cải biến không tự mình tồn tại trong tự nhiên. Do đó enzym cải biến là enzym không xuất hiện một cách tự nhiên.

Thuật ngữ "được cải biến", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là được thay đổi so với dạng xuất hiện một cách tự nhiên của nó. Enzym cải biến theo sáng chế tốt nhất là không phải enzym xuất hiện một cách tự nhiên hoặc các biến thể xuất hiện một cách tự nhiên. Nói cách khác, enzym cải biến theo sáng chế tốt nhất là các enzym cải biến không được tìm thấy trong tự nhiên. Enzym cải biến theo sáng chế tốt nhất không xuất hiện một cách tự ý.

Trong một số phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được điều chế bằng cách cải biến enzym mẹ hoặc enzym khung. Tuy nhiên, trong một số phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được điều chế mà không cần phải cải biến enzym mẹ hoặc enzym khung, ví dụ, nó có thể được điều chế bằng cách tổng hợp. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "xylanaza cải biến" hoặc "xylanaza GH10 cải biến" không có ý rằng xylanaza đã được điều chế bằng cách thay đổi enzym mẹ. Xylanaza cải biến có thể được điều chế phù hợp bằng các phương pháp khác, ví dụ, bằng cách tổng hợp.

Sử dụng

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, có thể được sử dụng phù hợp trong ứng dụng bất kỳ trong các ứng dụng sau:

- a) Chất phụ gia trong thức ăn chăn nuôi; và/hoặc
- b) Chất bổ sung cho thức ăn chăn nuôi cho động vật; và/hoặc
- c) Phá vỡ nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc (ví dụ, có thể là nguyên hạt hoặc hạt vỡ). Các sản phẩm bị phá vỡ (ví dụ glucoza) có thể được sử dụng làm nguyên liệu cấp cho quy trình lên men bất kỳ, như quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học) hay sản phẩm khác như các chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học) và đề cập đến sự tăng cường sử dụng nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc trong ngành nhiên liệu sinh học; và/hoặc

d) Ngành công nghiệp tách gluten-tinh bột ngũ cốc (ví dụ, lúa mì). Sản phẩm tạo thành có thể là tinh bột (ví dụ, tinh bột được tinh chế) và/hoặc gluten và/hoặc chất xơ và/hoặc chất tan trong nước (như pentosan tan). Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sản xuất tinh bột và/hoặc gluten; và/hoặc

e) Cải thiện quy trình nấu rượu bia hay tạo mạch nha, ví dụ bằng cách phá vỡ nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc (ví dụ, lúa mạch chứa mạch nha) và/hoặc

f) phân giải AXsol hoặc sản phẩm đã bị phá vỡ của AXinsol để đảm bảo độ nhớt không tăng và/hoặc độ nhớt giảm trong hỗn hợp phản ứng;

g) làm giảm độ nhớt khi phân giải nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc, ví dụ như quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học).

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi. Tốt nhất thức ăn chăn nuôi chứa ngô hoặc là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được sử dụng trong quy trình nấu rượu bia hay tạo mạch nha.

Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được sử dụng trong quy trình tách gluten-tinh bột lúa mì.

Theo một phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, được sử dụng để phá vỡ nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc và có thể là một phần của quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học).

Các ưu điểm

Enzym mới có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó như được đề cập trong bản mô tả này, có rất nhiều ưu điểm so với các xylanaza đã biết.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, có tính bền nhiệt. Ví

dụ, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, có độ ổn định nhiệt cao hơn đáng kể so với xylanaza mẹ (khung) trước khi cải biến. Xylanaza cải biến, một cách phù hợp, có giá trị T_m lớn hơn 70°C (tốt nhất là lớn hơn 75°C), trong đó giá trị T_m được đo là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, cũng rất mạnh trong khả năng hòa tan pentosan.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, rất mạnh trong khả năng hòa tan AXinsol.

Đáng ngạc nhiên là đã phát hiện ra rằng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, đặc biệt mạnh trong khả năng phân giải các nguyên liệu chứa xy-lan, như các arabinoxylan, ví dụ AXinsol, trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm ngô, lúa mì, DDGS, v.v., cụ thể là ngô và các cơ chất gốc ngô, cụ thể là cả sản phẩm từ lúa mì (bao gồm sản phẩm sản xuất từ lúa mì) và ngô (bao gồm sản phẩm sản xuất từ ngô). So với xylanaza chuẩn là các xylanaza được sản xuất và mua bán thương mại, xylanaza mới được đề cập trong bản mô tả này có khả năng phân giải và giải phóng pentosan hiệu quả hơn nhiều từ nhiều nguyên liệu có nguồn gốc thực vật hơn (cụ thể là cơ chất gốc ngô) so với các xylanaza bán trên thị trường. Đây là điều hoàn toàn bất ngờ. Điều này trái ngược với các enzym đã biết trước đây, các enzym này thường kém trong việc hòa tan AXinsol trong ngô hoặc cơ chất gốc ngô hoặc không có hiệu quả tương tự trong các cơ chất có gốc là lúa mì và ngô.

Ngoài ra, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, đặc biệt có hiệu quả không chỉ trong việc phá vỡ (hòa tan) AXinsol, mà còn có khả năng phá vỡ (hay phân giải) các polyme được hòa tan một cách hiệu quả. Do có khả năng phá vỡ (phân giải) hiệu quả (nhanh chóng) các polyme hòa tan (thu được từ việc hòa tan AXinsol), nên chúng sẽ giúp làm giảm độ nhớt. Hiệu ứng sau rất quan trọng trong một số ứng dụng yêu cầu bảo hộ.

Nhìn chung, xylanaza thông thường có thể phá vỡ AXinsol, nhưng thường sẽ làm tăng các sản phẩm sản xuất polyme, dẫn tới tăng độ nhớt của hỗn hợp. Độ nhớt tăng là điều bất lợi trong nhiều ứng dụng.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, và các enzym như được mô tả trong bản mô tả này được phát hiện là không những có thể phá vỡ (hòa tan) các arabinoxylan (AXinsol) không tan trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm ngô, lúa mì, DDGS, v.v., cụ thể là ngô và các cơ chất gốc ngô, cụ thể là cả sản phẩm từ lúa mì (bao gồm sản phẩm sản xuất từ lúa mì) và ngô (bao gồm sản phẩm sản xuất từ ngô), mà còn có thể phá vỡ các polyme được hòa tan đó một cách hiệu quả để đảm bảo độ nhớt sẽ không tăng và/hoặc làm giảm độ nhớt.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, và các enzym như được mô tả trong bản mô tả này có khả năng phân giải AXsol hoặc sản phẩm bị phá vỡ của AXinsol để đảm bảo độ nhớt không tăng và/hoặc độ nhớt giảm trong hỗn hợp phản ứng.

Nhiều xylanaza là các enzym GH11 được thương mại hóa để sử dụng trong thức ăn chăn nuôi nhằm mục đích hòa tan pentosan. Các chuyên gia trong ngành từ lâu đã cho rằng xylanaza GH10 không mạnh bằng xylanaza GH11 trong khả năng hòa tan các pentosan, cụ thể là AXinsol. Thật bất ngờ là người ta đã phát hiện ra loại xylanaza cải biến mới như được mô tả trong bản mô tả này, đó chính là xylanaza GH10, đặc biệt mạnh trong khả năng hòa tan AXinsol trong phạm vi rộng lớn các cơ chất, bao gồm các cơ chất gốc ngô. Đáng ngạc nhiên là, các nhà sáng chế đã phát hiện rằng xylanaza GH10 cải biến của sáng chế (và được đề cập trong bản mô tả này) đã vượt trội xylanaza GH11 thương mại trong khả năng hòa tan pentosan.

Việc các enzym này hòa tan hiệu quả AXinsol từ ngô và cơ chất gốc ngô là một ưu điểm đáng kể do ngô có nhiều AX dưới dạng không tan hơn rất nhiều so với các ngũ cốc khác, ví dụ như lúa mì và lúa mạch đen. Do đó chỉ các xylanaza có thể phá vỡ AXinsol mới có thể mang lại lợi ích đáng kể đối với động vật được nuôi bằng, ví dụ, khẩu phần ăn đậu nành - ngô.

Hoàn toàn bất ngờ rằng xylanaza GH10 lại mạnh đến thế trong khả năng hòa tan AXinsol trong ngũ cốc, cụ thể trong ngô và trong cơ chất gốc ngô.

Các enzym của sáng chế có thể phân giải hiệu quả (và nhanh chóng) polyme và/hoặc oligome được sản sinh từ việc hòa tan AXinsol hoặc có mặt trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc. Điều này dẫn tới ưu điểm bất ngờ của xylanaza GH10 cải biến được đề cập trong bản mô tả này ở chỗ chúng đặc biệt mạnh trong một số ứng dụng duy trì độ nhớt thấp hoặc giảm độ nhớt, ví dụ trong thức ăn chăn nuôi; trong quy trình nấu bia rượu và/hoặc tạo

mạch nha; trong sản xuất glucoza gốc hạt ngũ cốc, ví dụ trong chế biến chuyên sâu đối với nhiên liệu sinh học và/hoặc các chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học); hoặc trong ngành công nghiệp tách gluten-tinh bột lúa mì, ví dụ để sản xuất tinh bột.

Ngoài ra, xylanaza GH10 cải biến của sáng chế đặc biệt có tính bền nhiệt. Điều này đã mang lại các lợi ích đáng kể trong một số ứng dụng. Cụ thể, trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi, các enzym có thể phải trải qua quá trình xử lý nhiệt, ví dụ trong các quy trình tạo viên. Vì thế, các enzym này cần phải có khả năng duy trì hoạt tính của chúng sau khi trải qua bước xử lý này. Xylanaza cải biến của sáng chế bền nhiệt một cách đặc biệt và đáng ngạc nhiên.

Ngoài ra, độ ổn định nhiệt được nâng cao cũng rất có lợi trong quá trình phân giải tinh bột, quá trình này diễn ra trong điều kiện nhiệt độ cao trong khi hóa lỏng (khoảng 85-95°C). Khả năng chịu nhiệt cho phép enzym được bổ sung trong bước này.

Đáng chú ý là đã phát hiện ra rằng sản phẩm được phân giải từ việc sử dụng xylanaza cải biến có độ dài trung bình ngắn hơn đối với enzym GH10 được thử nghiệm trong bản mô tả so với enzym GH11. Điều này làm tăng hiệu quả của việc làm giảm độ nhớt.

Ngoài ra, một ưu điểm khác nữa của enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó theo sáng chế (không như nhiều xylanaza GH11) là chúng không bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế xylanaza lúa mì, ví dụ các chất ức chế protein giống TAXI, xuất hiện trong lúa mì.

Một ưu điểm của sáng chế là sáng chế cải thiện việc tách gluten-tinh bột lúa mì.

Enzym của sáng chế đặc biệt hữu hiệu trong việc làm tăng cường chất lượng của đối tượng hoặc cải thiện khả năng tiêu hóa nguyên liệu thô trong thức ăn chăn nuôi và/hoặc làm cải thiện hiệu quả của thức ăn chăn nuôi trong đối tượng.

Nguyên liệu chứa xylan

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa xylanaza cải biến của sáng chế), có thể được sử dụng để phân giải nguyên liệu chứa xylan bất kỳ.

Theo một phương án, nguyên liệu chứa xylan là nguyên liệu thực vật bất kỳ chứa arabinoxylan.

Theo một phương án, nguyên liệu chứa xylan là nguyên liệu thực vật bất kỳ chứa arabinoxylan không tan (AXinsol).

Theo một phương án, nguyên liệu chứa xylan là thức ăn chăn nuôi hoặc thành phần thức ăn chăn nuôi.

Theo một phương án, nguyên liệu chứa xylan là nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc (bao gồm nguyên hạt hoặc hạt vỡ hoặc ngũ cốc chứa mạch nha, ví dụ lúa mạch chứa mạch nha). Khi phương pháp liên quan tới sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ sản xuất cồn sinh học) thì tốt nhất nguyên liệu chứa xylan là nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc.

Theo phương án khác, nguyên liệu chứa xylan có thể là mạch nha lúa mạch hoặc dịch ngâm lúa mạch hoặc lúa mạch chứa mạch nha và các kết hợp của chúng.

Theo phương án khác nữa, nguyên liệu chứa xylan có thể là bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen hoặc lúa mạch). Khi phương pháp liên quan đến quá trình tách gluten-tinh bột, tốt nhất nguyên liệu chứa xylan là bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen hoặc lúa mạch).

Phá vỡ hoặc phân giải

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế, có thể được sử dụng để phá vỡ (phân giải) AXinsol hoặc AXsol hoặc các sản phẩm phân giải của AXinsol.

Thuật ngữ "phá vỡ" hoặc "phân giải" đồng nghĩa với thủy phân.

Sự hòa tan / phân giải

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân giải nguyên liệu chứa xylan, (tốt nhất là nguyên liệu chứa arabinoxylan, tốt nhất là nguyên liệu chứa arabinoxylan không tan (AXinsol)) để sản xuất pentosan tan (có thể là polyme, oligome hoặc monome).

Trong bản mô tả này, phương pháp này có thể được mô tả là sự hòa tan pentosan hoặc sự hòa tan arabinoxylan hoặc sự hòa tan AXinsol hoặc sự phân giải AXinsol.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến phương pháp phân giải (hoặc phá vỡ) arabinoxylan không tan (AXinsol). Phương pháp này cũng có thể được gọi là phương pháp hòa tan arabinoxylan không tan và/hoặc hòa tan pentosan.

Theo phương án khác của sáng chế, phương pháp liên quan đến phân giải (ví dụ, phá vỡ) các polyme có nguồn gốc từ sự phân giải arabinoxylan không tan.

Arabinoxylan (ax)

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “arabinoxylan” (AX) có nghĩa là polysacarit bao gồm khung xylan (1,4-đơn vị xyloza liên kết) với L-arabinofuranoza (L-arabinoza trong dạng vòng 5 nguyên tử của nó) được gắn ngẫu nhiên bởi $1\alpha \rightarrow 2$ và/hoặc $1\alpha \rightarrow 3$ liên kết tới các đơn vị xyloza trong toàn mạch. Arabinoxylan là hemixenluloza có trong cả thành tế bào sơ cấp và thành tế bào thứ cấp của thực vật. Arabinoxylan có thể có trong vỏ cám của các hạt ngũ cốc như lúa, ngô (bắp), lúa mạch đen và lúa mạch.

Arabinoxylan (AX) có mối quan hệ mật thiết với thành tế bào thực vật, tại đây nó có vai trò như chất keo liên kết các đơn thể khác nhau của thành tế bào thực vật và mô, khiến cho cả hai có cấu trúc bền vững và chắc chắn.

Thuật ngữ "pentosan" trong bản mô tả này chỉ nhóm hydrat cacbon bất kỳ sản sinh ra pentoza khi thủy phân hoàn toàn.

Do xyloza và arabinoza (các cấu tử của arabinoxylan) cùng là các pentoza, nên arabinoxylan thường được phân loại là pentosan.

AX là phần cất polysacarit không phải tinh bột (NSP) chính trong một số nguyên liệu thức ăn chăn nuôi quan trọng, bao gồm lúa mì và ngô.

Với số lượng dồi dào, việc có mặt trong nguyên liệu thực vật và cấu trúc phân tử khiến AX có tác động xấu, tiêu cực đối với sự tiêu hóa thức ăn chăn nuôi, làm giảm đáng kể giá trị dinh dưỡng trong nguyên liệu thô mà nó có mặt trong đó. Điều này khiến cho AX trở thành nhân tố kháng dinh dưỡng chính, làm giảm hiệu quả sản xuất của động vật.

Ngoài ra AX có thể có tác động xấu, tiêu cực khi cố phá vỡ nguyên liệu thực vật, ví dụ, trong các quy trình như nấu rượu bia, tạo mạch nha, sản xuất nhiên liệu sinh học, làm giảm đáng kể lượng cơ chất có thể tiếp cận được trong nguyên liệu thực vật thô.

AX cũng có thể giữ một lượng lớn nước (có thể được gọi là khả năng giữ nước của chúng) - khả năng này có thể khiến các arabinoxylan tan gây ra độ nhớt (cao) - đây là điểm bất lợi trong nhiều ứng dụng.

Thuật ngữ “Hemixenluloza” – như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các thành phần polysacarit của thành tế bào thực vật ngoài xenluloza. Thuật ngữ “hemixenluloza” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ các polysacarit trong thành tế bào thực vật có thể được chiết xuất bằng các dung dịch kiềm pha loãng. Hemixenluloza bao gồm khoảng một phần ba hydrat cacbon trong mô thực vật là thân gỗ. Cấu trúc hóa học của hemixenluloza bao gồm các mạch dài của các loại pentoza, hexoza, và các axit uronic tương ứng của chúng. Có thể tìm thấy hemixenluloza trong

trái cây, thân cây và vỏ hạt ngũ cốc. Xylan là một ví dụ về pentosan bao gồm các đơn vị D-xyloza với $1\beta\rightarrow4$ liên kết.

Arabinoxylan không tan trong nước (AXinsol)

Arabinoxylan không tan trong nước (AXinsol) còn được gọi là arabinoxylan không thể chiết xuất trong nước (WU-AX) tạo thành tỷ lệ đáng kể chất khô của nguyên liệu thực vật.

Ở lúa mì, AXinsol có thể chiếm 6,3% chất khô. Trong vỏ cám lúa mì và DDGS lúa mì, AXinsol có thể chiếm khoảng 20,8% hoặc 13,4% chất khô (khối lượng/khối lượng).

Ở lúa mạch đen, AXinsol có thể chiếm 5,5% chất khô.

Ở ngô, AXinsol có thể chiếm 3,5-6% (ví dụ 5,1%) chất khô. Trong DDGS ngô, AXinsol có thể chiếm 10-20% (ví dụ 12,6%) chất khô.

AXinsol gây nên hiện tượng giữ chất dinh dưỡng trong thức ăn chăn nuôi. Khối lượng lớn chất dinh dưỡng có thể tiêu hóa dễ dàng như tinh bột và protein sẽ bị giữ lại dưới dạng bị bao bọc trong các cụm vật chất thành tế bào hoặc bị kết dính với các mạch bên của AX. Các chất dinh dưỡng bị giữ lại này sẽ không được tiêu hóa và tiếp đó là không được hấp thụ trong ruột non.

Arabinoxylan tan trong nước (AXsol)

Arabinoxylan tan trong nước (AXsol) còn được gọi là arabinoxylan có thể chiết xuất trong nước (WE-AX) có thể gây ra các vấn đề trong sản xuất nhiên liệu sinh học, sản xuất chất sinh hóa, xử lý hydrat carbon và/hoặc quy trình nấu rượu bia và/hoặc tạo mạch nha và/hoặc trong thức ăn chăn nuôi do AXsol có thể làm tăng độ nhớt do khả năng liên kết với nước của chúng.

Trong thức ăn chăn nuôi, AXsol có thể có hiệu ứng kháng dinh dưỡng, cụ thể trong động vật dạ dày đơn, do chúng làm tăng đáng kể độ nhớt của các chất chứa trong ruột, hiện tượng này bắt nguồn từ khả năng liên kết với nước vượt trội của AXsol. Việc tăng độ nhớt có thể ảnh hưởng đến sự tiêu hóa thức ăn và sử dụng chất dinh dưỡng do hiện tượng này có thể ngăn cản việc trộn thức ăn đúng cách bằng các enzym tiêu hóa và muối mật và/hoặc làm chậm lại sự khả dụng cũng như sự hấp thụ chất dinh dưỡng và/hoặc kích thích sự lên men trong phần ruột sau.

Ở lúa mì, AXsol có thể chiếm 1,8% chất khô. Trong vỏ cám lúa mì và DDGS lúa mì, AXsol có thể chiếm khoảng 1,1% hoặc 4,9% chất khô (khối lượng/khối lượng).

Ở lúa mạch đen, AXsol có thể chiếm 3,4% chất khô.

Ở lúa mạch, AXsol có thể chiếm 0,4-0,8% chất khô.

Ở ngô, AXsol có thể chiếm 0,1-0,4% (ví dụ 0,1%) chất khô. Trong DDGS ngô, AXinsol có thể chiếm 0,3-2,5% (ví dụ 0,4%) chất khô.

Tuy nhiên, ngoài lượng AXsol có mặt trong nguyên liệu thực vật, khi xylanaza hòa tan AXinsol trong nguyên liệu thực vật, nó có thể giải phóng pentosan và/hoặc oligome, đây là các thành phần góp phần vào hàm lượng AXsol trong nguyên liệu thực vật.

Một ưu điểm đáng kể của xylanaza cải biến công bố trong bản mô tả này là chúng có khả năng hòa tan AXinsol mà không làm tăng độ nhớt. Người ta tin rằng ngay sau đó các sản phẩm có khối lượng phân tử cao sẽ không được tạo ra.

Sự phá vỡ AXsol có thể làm giảm độ nhớt.

Sự phá vỡ AXsol có thể làm giải phóng chất dinh dưỡng.

Độ nhớt

Sáng chế này có thể được sử dụng để đảm bảo độ nhớt không bị tăng và/hoặc để làm giảm độ nhớt trong quy trình bất kỳ trong đó khả năng liên kết với nước của AXsol sẽ làm tăng độ nhớt một cách không mong muốn.

Sáng chế đề cập đến sự đảm bảo độ nhớt sẽ không bị tăng và/hoặc đến sự làm giảm độ nhớt bằng cách phá vỡ (phân giải) AXsol hoặc bằng cách phá vỡ (phân giải) polyme/oligome được sản sinh khi hòa tan AXinsol.

Không bị ràng buộc bởi học thuyết bất kỳ, do có khả năng phá vỡ (phân giải) hiệu quả (nhanh chóng) các polyme bị hòa tan (ví dụ, oligome) sản sinh từ việc hòa tan AXinsol, có thể tránh được việc tăng độ nhớt không mong muốn và/hoặc làm giảm độ nhớt. Thuật ngữ "hiệu quả" trong bản mô tả này có nghĩa là enzym có khả năng phân giải các polyme (ví dụ, oligome) được tạo thành từ việc hòa tan AXinsol nhanh hơn tốc độ AXinsol bị phân giải (hoặc bị hòa tan).

Việc làm giảm độ nhớt có nhiều ưu điểm trong nhiều ứng dụng được đề cập đến trong bản mô tả này.

Một xét nghiệm trong ống nghiệm đã thử mô phỏng môi trường trong ruột non của gà, được trình bày lần đầu tiên bởi Bedford & Classen (1993 Poultry Sci. (Khoa học gia cầm), 72, 137-143). Xét nghiệm bao gồm hai bước, trước hết là bước ủ thức ăn trong môi trường có độ pH thấp với pepsin, sau đó ủ với dịch tụy trong môi trường có độ pH trung hòa. Nhìn chung, người ta đã công nhận rằng độ nhớt của lớp bề mặt sau khi kết thúc ủ tương quan với độ nhớt tạo trong cơ thể sống trong các con gà giò.

Không làm tăng độ nhớt và/hoặc làm giảm độ nhớt như đề cập trong bản mô tả này đối với các ứng dụng thức ăn chăn nuôi có nghĩa là việc bổ sung xylanaza sẽ có kết quả là độ nhớt không thay đổi hoặc đạt được độ nhớt thấp hơn như đã được đo bằng phương pháp mô tả trong Ví dụ 1. Không thay đổi có nghĩa là giá trị đo được, là trung bình số của ba lần đo lặp lại, sẽ rơi vào trong hai độ lệch chuẩn của giá trị đo được đối với mẫu lúa mì không bổ sung xylanaza.

Có thể đo độ nhớt bằng các thiết bị sau: Thiết bị phân tích Rapid ViscoAnalyzer (RVA) (ví dụ, trong chế biến cón sinh học) và máy đo độ nhớt Haake VT550 (Thermofisher) (ví dụ trong chế biến tinh bột gluten lúa mì). Cả hai thiết bị đều có thể giám sát được mức độ nhớt trong các quy trình etanol nhiên liệu và quy trình tách tinh bột lúa mì, các điều kiện thử nghiệm của các quy trình này được lần lượt nêu trong Ví dụ 6 và 7.

Trong sáng chế, có thể tính được mức giảm độ nhớt bằng cách so sánh một mẫu bao gồm xylanaza của sáng chế (hoặc được nêu trong bản mô tả này) so với mẫu so sánh khác không có xylanaza của sáng chế (hoặc được nêu trong bản mô tả này).

Việc so sánh mức giảm độ nhớt của xylanaza của sáng chế với mức giảm độ nhớt của (các) xylanaza chuẩn trên thị trường sẽ minh chứng hiệu quả hoạt động của enzym. Mục đích là làm tăng hiệu quả hoạt động của enzym so với mức chuẩn của thị trường. (Các) enzym chuẩn cho từng ứng dụng được cung cấp trong các ví dụ dưới đây.

Enzym chuẩn để so sánh mức giảm độ nhớt trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi có thể là Econase®XT.

Ví dụ về xylanaza được sử dụng trong ngành cón sinh học là Xylathin™.

Ví dụ về xylanaza được sử dụng trong ngành tách gluten-tinh bột lúa mì là Shearzyme™.

Enzym chuẩn để xem xét độ ổn định nhiệt có thể là xylanaza mẹ (khung) (ví dụ trước khi cải biến).

Theo một phương án của sáng chế, các xylanaza được đề cập trong bản mô tả này là chất khử độ nhớt.

Nhìn chung, lúa mì (hoặc ngũ cốc khác) trước hết được xay xát khô để tách vỏ cám và mầm ra khỏi nội nhũ, nội nhũ này sẽ được xay ra thành bột. Bột nội nhũ sau đó được cắt phân đoạn thêm trong quy trình tách tinh bột lúa mì thành một số dòng sản phẩm có giá trị thương mại khác nhau. Mục đích chính là để tạo tinh bột hạng A được tinh chế, bao gồm các hạt lớn dạng thấu kính có đường kính nằm trong khoảng 15-40 µm. Dòng thứ hai

là tinh bột hạng B bao gồm các hạt tinh bột kém tinh khiết hơn, có hình cầu và nhỏ (1-10 μm). (C.C. Maningat, P.A. Seib, S.D. Bassi, K.S. Woo, G.D. Lasater, *Chương 10 cuốn "Tinh bột" (2009) 441-451, Tinh bột lúa mì: sản xuất, tính chất, cải biến và sử dụng*). Tinh bột lúa mì phân lập tạo nguyên liệu để sản xuất tinh bột cải biến với các ứng dụng trong thực phẩm và phi thực phẩm. Bột gluten là sản phẩm thứ ba có giá trị gia tăng trong các quy trình tách lúa mì. Tính bền dai của gluten lúa mì phân lập được xác định bởi khả năng tạo các mạng lưới dính và đàn hồi cần thiết cho việc làm bánh mì. Bột gluten bao gồm cacbon đioxit được tạo khi chuẩn bị bột nhồi trong quá trình làm bánh, kết quả là làm tăng kích thước bánh mì. (Anne van der Borgh, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, *Journal of Cereal Science (Tập chí Khoa học về ngũ cốc) 41 (2005) 221-237, Cắt phân đoạn lúa mì và bột lúa mì thành tinh bột và gluten: toàn cảnh các quy trình chính và các yếu tố liên quan*). Do đó, nó thường được dùng để làm giàu bột làm bánh mì, để thu được các sản phẩm bánh mì tốt hơn. Các thị trường khác cho gluten bao gồm gluten làm chất phụ gia trong các sản phẩm chay, thịt, cá hoặc gia cầm, bao gồm sản phẩm trong ngành thực phẩm cho thú nuôi làm cảnh; trong bữa ăn phụ bằng ngũ cốc; hoặc trong nước tương. Nhờ độ ổn định nhiệt và các tính chất tạo màng tốt, gluten cũng được sử dụng trong các thị trường phi thực phẩm làm chất keo dán. (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W. Wrigley, *Các xu hướng trong Khoa học & Công nghệ thực phẩm 17 (2006) 82-90, Sử dụng gluten lúa mì và nhu cầu trong công nghiệp*).

Các xylanaza cải biến đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng để làm giảm độ nhớt (hoặc không làm tăng độ nhớt) trong các quy trình tách bột ngũ cốc (ví dụ, bột lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen hoặc lúa mạch) thành các phân cắt tinh bột và gluten và để cải thiện việc tách bằng cách phân giải oligosacarit, chất này ngăn cản quá trình kết tụ gluten.

Độ nhớt của dịch đường, và độ nhớt của dịch ngâm lúa mạch và mạch nha lúa mạch trong quy trình nấu rượu bia và tạo mạch nha có thể gây ra những bất lợi đáng kể trong quá trình nấu rượu bia và tạo mạch nha. Sáng chế đề cập tới việc giảm độ nhớt (hoặc không làm tăng độ nhớt) của dịch đường, dịch ngâm lúa mạch và mạch nha lúa mạch hoặc kết hợp của chúng.

Thức ăn gia súc hay thức ăn chăn nuôi

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được sử dụng làm - hoặc trong chế biến - thức ăn chăn nuôi.

Thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi" được sử dụng cùng nghĩa với "thức ăn gia súc" trong bản mô tả này.

Tốt nhất nguyên liệu chứa arabinoxylan của sáng chế là thức ăn chăn nuôi, hoặc cấu tử của thức ăn chăn nuôi, hoặc là thành phần của thức ăn chăn nuôi.

Thức ăn chăn nuôi có thể có dạng dung dịch hoặc dạng rắn hoặc bán rắn - tùy vào cách sử dụng và/hoặc chế độ áp dụng và/hoặc phương thức sử dụng.

Khi được sử dụng làm - hoặc trong chế biến - thức ăn chăn nuôi - như thức ăn chăn nuôi chức năng - enzym hoặc chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều trong số các chất sau: chất mang được chấp nhận về mặt dinh dưỡng, chất pha loãng được chấp nhận về mặt dinh dưỡng, tá dược được chấp nhận về mặt dinh dưỡng, chất phụ gia được chấp nhận về mặt dinh dưỡng, thành phần hoạt tính được chấp nhận về mặt dinh dưỡng.

Theo một phương án ưu tiên, enzym hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế được trộn với thành phần thức ăn chăn nuôi để tạo nên thức ăn chăn nuôi.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thành phần thức ăn chăn nuôi" có nghĩa là tất cả hoặc một phần của thức ăn chăn nuôi. Một phần của thức ăn chăn nuôi có thể có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một cấu tử của thức ăn chăn nuôi, ví dụ 2 hoặc 3 hoặc 4. Theo một phương án, thuật ngữ "thành phần thức ăn chăn nuôi" bao gồm cả các hỗn hợp sơ chế hoặc cấu tử của hỗn hợp sơ chế.

Tốt nhất, thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn thô gia súc, hoặc hỗn hợp sơ chế của nó, là thức ăn chăn nuôi hỗn hợp hoặc hỗn hợp sơ chế của nó. Theo một phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn chăn nuôi hỗn hợp, thành phần thức ăn chăn nuôi hỗn hợp hoặc với hỗn hợp sơ chế của thức ăn chăn nuôi hỗn hợp hoặc với thức ăn thô gia súc, thành phần thức ăn thô gia súc, hoặc hỗn hợp sơ chế của thức ăn thô gia súc.

Trong bản mô tả này, "thức ăn thô gia súc" chỉ thức ăn bất kỳ được cung cấp cho động vật (không phải do động vật tự kiếm được). Thức ăn thô gia súc bao gồm thực vật được cắt nhỏ.

Thuật ngữ thức ăn thô gia súc bao gồm cỏ ủ tươi, thức ăn dạng nén và dạng viên, dầu và khẩu phần thức ăn trộn, đồng thời cả mầm hạt ngũ cốc và rau đậu.

Có thể thu được thức ăn thô gia súc từ một hay nhiều thực vật được chọn từ: ngô (bắp), cỏ linh lăng (Lucerne), lúa mạch, cỏ ba lá chân chim, cải bắp, cải xoăn, cải dầu (canola), củ cải (Thụy Điển), củ cải, cỏ ba lá, cỏ ba lá lai, cỏ ba lá đỏ, cỏ ba lá mọc

ngâm, cỏ ba lá trắng, cỏ roi, cỏ giống yến mạch, kê, yến mạch, cao lương, đậu nành, cây các loại (chồi của cây bấm đọt để tạo thức ăn khô), lúa mì, và rau đậu.

Thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi hỗn hợp" chỉ thức ăn chăn nuôi thương mại dưới dạng bột, dạng viên, hạt, bánh hoặc bánh hấp. Thức ăn chăn nuôi hỗn hợp có thể được trộn từ nhiều nguyên liệu và chất phụ gia khác nhau. Các hỗn hợp này có công thức theo yêu cầu cụ thể của động vật đối tượng.

Thức ăn chăn nuôi hỗn hợp có thể là thức ăn chăn nuôi hoàn chỉnh cung cấp tất cả dưỡng chất cần thiết hàng ngày, các sản phẩm cô đặc cung cấp một phần của khẩu phần ăn (protein, năng lượng), hoặc các chất bổ sung chỉ cung cấp chất dinh dưỡng vi lượng bổ sung, như khoáng chất và vitamin.

Thành phần chính được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi hỗn hợp là các loại hạt ngũ cốc, bao gồm: ngô, lúa mì, bột cải dầu thô, bột canola thô, đậu lupin, đậu nành, cao lương, yến mạch và lúa mạch.

Trong bản mô tả này, hỗn hợp sơ chế có thể phù hợp là chế phẩm được làm từ các vi hợp phần như vitamin, khoáng chất, hóa chất bảo quản, thuốc kháng sinh, sản phẩm lên men, và các thành phần quan trọng khác. Hỗn hợp sơ chế thường là các chế phẩm phù hợp để trộn thành các suất ăn thương mại.

Thức ăn chăn nuôi bất kỳ của sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều nguyên liệu thức ăn được chọn từ nhóm bao gồm a) ngũ cốc, như các loại ngũ cốc hạt nhỏ (ví dụ, lúa mì, lúa mạch đen, lúa mạch, yến mạch, tiểu hắc mạch và kết hợp của chúng) và hạt lớn như ngô hoặc cao lương; b) phụ phẩm từ ngũ cốc, như bột gluten ngô, đường miếng ẩm (cụ thể đường miếng ẩm có nguồn gốc từ ngô), bã ngũ cốc lên men (Distillers Dried Grain, DDG) (cụ thể là bã ngũ cốc lên men có nguồn gốc từ ngô (DDG ngô)), bã rượu khô (Distillers Dried Grain Solubles, DDGS) (cụ thể là bã rượu khô có nguồn gốc từ ngô (DDGS ngô)), vỏ cám lúa mì, lúa mì tấm, vụn lúa mì, cám gạo, vỏ trấu hạt gạo, vỏ trấu yến mạch, hạt cọ, và bột nhão từ quả họ cam quýt; c) protein thu được từ các nguồn như đậu nành, hạt hướng dương, đậu phộng, đậu lupin, đậu Hà Lan, đậu răng ngựa, hạt bông, dầu hạt cải, bột cá, đạm bột huyết tương khô, bột xương thịt, đạm khoai tây, nước sữa, khô dừa, khô vùng d) dầu và mỡ thực vật và động vật; e) khoáng chất và vitamin.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi bao gồm hay gồm có ngô, DDGS (như DDGS ngô), lúa mì, cám lúa mì hoặc kết hợp các thành phần này.

Theo một phương án, thành phần thức ăn chăn nuôi có thể là ngô, DDGS (như DDGS ngô), lúa mì, cám lúa mì hoặc kết hợp các thành phần này.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi bao gồm hay gồm có ngô, DDGS (như DDGS ngô) hoặc kết hợp các thành phần này.

Theo một phương án, thành phần thức ăn chăn nuôi có thể là ngô, DDGS (như DDGS ngô) hoặc kết hợp các thành phần này.

Thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể chứa ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc ít nhất 60% khối lượng bột ngô và bột đậu nành hoặc ngô và chế phẩm đậu nành còn nguyên chất béo, hoặc bột lúa mì hoặc bột hạt hướng dương.

Thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể chứa khoảng 5 đến khoảng 40% DDGS ngô. Đối với gia cầm - thức ăn chăn nuôi có thể chứa trung bình khoảng 7 đến 15% DDGS ngô. Đối với lợn (heo) - thức ăn chăn nuôi có thể chứa trung bình 5 đến 40% DDGS ngô.

Thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể chứa ngô là loại ngũ cốc duy nhất, trong trường hợp này, thức ăn chăn nuôi có thể chứa khoảng 35 đến khoảng 80% là ngô.

Trong thức ăn chăn nuôi bao gồm ngũ cốc trộn, ví dụ bao gồm ngô và lúa mì, thức ăn chăn nuôi có thể chứa ít nhất 10% là ngô.

Ngoài ra, hay hoặc là, thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể chứa ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ và/hoặc ít nhất một phụ phẩm của ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ để cung cấp thức ăn chăn nuôi có hàm lượng chất xơ cao. Các ví dụ về nguyên liệu nhiều xơ bao gồm: lúa mì, lúa mạch đen, lúa mạch, yến mạch, phụ phẩm từ ngũ cốc, như bột gluten ngô, thức ăn từ gluten ngô, đường miêng ẩm, bã ngũ cốc lên men (DDG), bã rượu khô (DDGS), cám lúa mì, lúa mì tấm, vụn lúa mì, cám gạo, vỏ trấu hạt gạo, vỏ trấu yến mạch, hạt cọ, và bột nhão từ quả họ cam quýt. Một số nguồn protein cũng có thể được coi là chứa nhiều xơ: protein thu được từ các nguồn như hạt hướng dương, đậu lupin, đậu răng ngựa và hạt bông.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi của sáng chế bao gồm ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ và/hoặc ít nhất một phụ phẩm của ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, bã rượu khô (DDGS) - cụ thể là DDGS ngô, đường miêng ẩm, bã ngũ cốc lên men (DDG) - cụ thể là DDG ngô, cám lúa mì, và lúa mì.

Theo một phương án, thức ăn chăn nuôi của sáng chế bao gồm ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ và/hoặc ít nhất một phụ phẩm của ít nhất một nguyên liệu nhiều xơ được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, bã rượu khô (DDGS) - cụ thể là DDGS ngô, cám lúa mì, và lúa mì.

Trong sáng chế, thức ăn chăn nuôi có thể là một hoặc nhiều trong số thức ăn sau: thức ăn chăn nuôi hỗn hợp và hỗn hợp sơ chế, bao gồm viên, hạt hoặc bánh (cho gia súc); cây trồng hoặc phần bỏ đi của cây trồng: ngô, đậu nành, cao lương, yến mạch, khô lúa mạch, rơm, rơm rạ băm, phần bỏ đi của củ cải đường, bột cá, bột xương thịt, mật mía, bánh khô dầu và bánh ép; oligosacarit; thực vật cây cỏ làm thức ăn dự trữ: cỏ ủ tươi; rong biển; hạt trong quả và ngũ cốc hạt, còn nguyên hạt hoặc được chế biến bằng cách nghiền, xay, v.v; mầm hạt ngũ cốc và rau đậu; chiết xuất nấm men.

Thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi" trong sáng chế trong một số phương án bao gồm thức ăn cho vật nuôi làm cảnh. Thức ăn cho vật nuôi làm cảnh là nguyên liệu thực vật hay động vật được chế biến cho thú cưng ăn, như thức ăn cho chó hoặc cho mèo. Thức ăn cho vật nuôi làm cảnh, như thức ăn cho chó hoặc cho mèo, có thể có dạng khô, như bột nghiền thô cho chó, hoặc có dạng ướt đóng hộp. Thức ăn cho mèo có thể chứa axit amin taurin.

Thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi" trong sáng chế trong một số phương án bao gồm thức ăn cho cá. Thức ăn cho cá thường chứa chất dinh dưỡng đa lượng, nguyên tố vi lượng và vitamin cần thiết để cá sống khỏe mạnh. Thức ăn cho cá có thể có dạng cốm, viên hoặc viên nén. Dạng viên, một số chìm rất nhanh, thường được sử dụng cho cá lớn hơn hoặc các loài kiếm ăn dưới tầng đáy. Một số thức ăn cho cá còn chứa chất phụ gia, như beta caroten hoặc hormon giới tính, để tăng cường màu sắc của cá cảnh.

Thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi" trong sáng chế trong một số phương án bao gồm thức ăn cho chim. Thức ăn cho chim bao gồm thức ăn được sử dụng trong máng cho chim ăn và để nuôi chim cảnh. Thông thường, thức ăn cho chim bao gồm nhiều loại hạt khác nhau, nhưng có thể bao gồm mỡ rắn (mỡ bò hoặc cừu).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được tiếp xúc" chỉ việc sử dụng gián tiếp hay trực tiếp enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế vào sản phẩm (ví dụ, thức ăn chăn nuôi). Các ví dụ về các phương pháp sử dụng có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn trong các phương pháp sau: xử lý sản phẩm trong nguyên liệu bao gồm chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, áp dụng trực tiếp bằng cách trộn chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi với sản phẩm, phun chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi lên bề mặt sản phẩm hoặc nhúng sản phẩm vào hỗn hợp chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế tốt nhất là được trộn với sản phẩm (ví dụ, thức ăn chăn nuôi). Hoặc, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể có trong nhũ tương hay thành phần thô của thức ăn chăn nuôi.

Trong một số ứng dụng, việc chế phẩm được chế biến sẵn trên bề mặt của sản phẩm sẽ bị ảnh hưởng/xử lý là rất quan trọng. Việc này cho phép chế phẩm truyền một hoặc nhiều trong số các đặc điểm có lợi sau đây: các lợi ích về hiệu quả hoạt động.

Enzym cải biến (hoặc chế phẩm chứa enzym cải biến) của sáng chế có thể được sử dụng để rắc lên, bao phủ và/hoặc tẩm lên sản phẩm (ví dụ, thức ăn chăn nuôi hoặc thành phần thô của thức ăn chăn nuôi) với một lượng kiểm soát.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế được trộn đồng nhất hóa để tạo bột.

Theo một phương án ưu tiên khác, enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế có công thức dạng hạt như mô tả trong WO2007/044968 (được gọi là hạt TPT) hoặc WO1997/016076 hoặc WO1992/012645, các tài liệu này hợp nhất với bản mô tả này bằng viện dẫn.

Theo phương án ưu tiên khác, khi chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có công thức dạng hạt, các hạt bao gồm lớp muối chắt hydrat hóa bao phủ lên lõi protein. Ưu điểm của lớp vỏ muối này là giúp khả năng chịu nhiệt được cải thiện, độ ổn định trong điều kiện bảo quản và khả năng bảo vệ tăng lên đối với các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi khác có ảnh hưởng bất lợi lên enzym.

Tốt nhất là, muối sử dụng trong vỏ muối có hoạt tính trong nước lớn hơn 0,25 hoặc độ ẩm không đổi lớn hơn 60% ở 20°C.

Tốt nhất là, vỏ muối chứa Na_2SO_4 .

Phương pháp điều chế enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế có thể còn bao gồm thêm bước tạo viên từ bột. Bột có thể được trộn với các thành phần khác đã biết trong ngành. Bột, hoặc hỗn hợp bao gồm bột, có thể bị ép vào khuôn và các sợi đi ra được cắt thành các viên có chiều dài khác nhau phù hợp.

Tùy chọn, bước tạo viên có thể bao gồm bước xử lý bằng hơi, hoặc giai đoạn xử lý với nước và nhiệt, trước khi tạo viên. Hỗn hợp bao gồm bột được cho vào máy khuấy trộn, ví dụ, máy trộn có phun hơi nước. Hỗn hợp được làm nóng trong máy khuấy trộn đến nhiệt độ cụ thể, như bằng từ 60-100°C, nhiệt độ thông thường là 70°C, 80°C, 85°C, 90°C hoặc 95°C. Thời gian hỗn hợp lưu trong máy có thể khác nhau, từ khoảng thời gian tính bằng giây đến tính bằng phút và thậm chí tính bằng giờ. Như 5 giây, 10 giây, 15 giây, 30 giây, 1 phút 2 phút, 5 phút, 10 phút, 15 phút, 30 phút và 1 giờ.

Rõ ràng là enzym (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế phù hợp để được bổ sung vào nguyên liệu thức ăn chăn nuôi thích hợp bất kỳ.

Chuyên gia trong ngành sẽ hiểu là các động vật khác nhau sẽ yêu cầu các loại thức ăn khác nhau, và ngay cả cùng loại động vật cũng có thể yêu cầu các loại thức ăn khác nhau, tùy thuộc vào mục đích nuôi động vật đó.

Tùy chọn, thức ăn chăn nuôi cũng có thể chứa khoáng chất bổ sung, ví dụ như canxi và/hoặc vitamin bổ sung.

Tốt nhất là, thức ăn chăn nuôi là hỗn hợp bột đậu nành và ngô.

Theo một phương án, tốt nhất thức ăn chăn nuôi không phải là thức ăn cho động vật nuôi làm cảnh.

Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi được đề xuất. Thức ăn chăn nuôi thường được sản xuất trong các nhà máy thức ăn chăn nuôi trong đó nguyên liệu thô trước hết được xay cho đến khi có kích thước hạt phù hợp và sau đó được trộn với phụ gia phù hợp. Thức ăn chăn nuôi sau đó có thể được sản xuất thành dạng hỗn hợp cám hoặc dạng viên; dạng viên thường liên quan đến phương pháp trong đó nhiệt độ được tăng đến mức nhất định và sau đó thức ăn chăn nuôi được cho qua khuôn để tạo viên có kích thước cụ thể. Các viên này được để nguội. Sau đó, có thể thêm chất phụ gia lỏng như mỡ và enzym vào. Sản xuất thức ăn chăn nuôi cũng có thể liên quan đến bước bổ sung bao gồm ép trồi và cho giãn nở trước khi tạo viên - cụ thể bằng các kỹ thuật phù hợp có thể bao gồm ít nhất bước sử dụng hơi nước.

Thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi cho động vật dạ dày đơn, như gia cầm (ví dụ, gà giò, gà mái, gà giống, gà tây, vịt, ngỗng, chim nước), và lợn (tất cả các loại), động vật nhai lại như gia súc (ví dụ, bò sữa hoặc bò đực (bao gồm bê con)), ngựa, cừu, thú cưng (ví dụ chó, mèo) hoặc cá (ví dụ, cá không có dạ dày, cá có dạ dày, cá nước ngọt như cá hồi, cá tuyết, cá hồi vân và cá chép, ví dụ, cá chép Nhật Bản, cá biển như cá mú, và loài giáp xác như tôm, trai và sò). Tốt nhất thức ăn chăn nuôi là cho gia cầm.

Thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô

Theo một phương án ưu tiên, thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô" có nghĩa là thức ăn chăn nuôi bao gồm hoặc gồm có ngô (bắp) hoặc phụ phẩm của ngô.

Tốt nhất là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô bao gồm ngô hoặc phụ phẩm của ngô là cấu tử chính. Ví dụ, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô có thể bao gồm ít nhất 35% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất 40% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất

50% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất 60% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất 70% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất 80% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, như ít nhất 90% ngô hoặc phụ phẩm của ngô, ví dụ 100% ngô hoặc phụ phẩm của ngô.

Trong một số phương án, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô có thể bao gồm ngô hoặc phụ phẩm của ngô làm cấu tử phụ; trong trường hợp này, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô có thể được bổ sung ngô hoặc phụ phẩm của ngô. Ví dụ, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ ngô có thể bao gồm, ví dụ, lúa mì được bổ sung ngô hoặc phụ phẩm của ngô.

Khi ngô hoặc phụ phẩm của ngô là cấu tử phụ của thức ăn chăn nuôi, ngô hoặc phụ phẩm của ngô chiếm ít nhất 5%, tốt nhất là ít nhất 10%, tốt nhất là ít nhất 20%, tốt nhất là ít nhất 30% thức ăn chăn nuôi.

Để tránh nhầm lẫn, thuật ngữ "ngô" trong bản mô tả này đồng nghĩa với bắp, ví dụ, ngô có danh pháp *Zea mays*.

Theo một phương án, phụ phẩm của ngô có thể là bã rượu ngô khô (DDGS ngô) hoặc đường miêng ẩm sản xuất từ ngô hoặc ngũ cốc ngô lên men (DDG) hoặc bột gluten ngô hoặc thức ăn là gluten ngô hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo một phương án, tốt nhất nguyên liệu chứa arabinoxylan của sáng chế chứa phụ phẩm của ngô, như bã rượu ngô khô (DDGS ngô) hoặc đường miêng ẩm sản xuất từ ngô hoặc ngũ cốc ngô lên men (DDG) hoặc bột gluten ngô hoặc thức ăn là gluten ngô hoặc sự kết hợp của chúng.

Thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì

Theo một phương án ưu tiên, thức ăn chăn nuôi có thể là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì" có nghĩa là thức ăn chăn nuôi bao gồm hoặc gồm có lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì.

Tốt nhất là thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì bao gồm lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì làm cấu tử chính. Ví dụ, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì có thể bao gồm ít nhất 40% lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì, như ít nhất 60% lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì, như ít nhất 80% lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì, như ít nhất 90% lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì, ví dụ 100% lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì.

Trong một số phương án, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì có thể bao gồm lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì làm cấu tử phụ; trong trường hợp này, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ lúa mì có thể được bổ sung lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì. Ví dụ, thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm, ví dụ, lúa mì được bổ sung lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì.

Khi lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì là cấu tử phụ của thức ăn chăn nuôi, lúa mì hoặc phụ phẩm của lúa mì chiếm ít nhất 5%, tốt nhất là ít nhất 10%, tốt nhất là ít nhất 20%, tốt nhất là ít nhất 30% thức ăn chăn nuôi.

Theo một phương án, phụ phẩm của lúa mì có thể là, ví dụ, vỏ cám lúa mì, lúa mì tấm, chất xơ lúa mì.

Vỏ cám là lớp bên ngoài cứng của hạt và gồm có hạt aloron và vỏ hạt. Cùng với mầm, nó là phần hợp nhất của toàn bộ hạt, thường được tạo làm phụ phẩm của quá trình xay xát khi sản xuất hạt tinh chế. Khi vỏ cám bị tách ra khỏi hạt, hạt sẽ bị mất một phần giá trị dinh dưỡng của nó. Vỏ cám có trong ngũ cốc và có thể đã bị xát bỏ đi từ hạt ngũ cốc bất kỳ, bao gồm lúa gạo, ngô (bắp), lúa mì, yến mạch, lúa mạch và kê. Vỏ cám đặc biệt giàu chất xơ thực phẩm và các axit béo quan trọng và chứa số lượng đáng kể tinh bột, protein, vitamin và khoáng chất thực phẩm.

Lúa mì tấm là các hạt thô và mịn của phần cám lúa mì và là các hạt mịn của vụn lúa mì, mầm lúa mì, bột lúa mì và các phế phẩm không quan trọng khác.

Lúa mì tấm là phụ phẩm rẻ tiền trung gian giữa thức ăn cho người và thức ăn cho động vật. Theo một phương án, tốt nhất là nguyên liệu chứa arabinoxylan của sáng chế bao gồm cám lúa mì và/hoặc lúa mì tấm.

Đường miếng ẩm, bã ngũ cốc lên men (DDG) và bã rượu khô (DDGS)

Đường miếng ẩm, bã ngũ cốc lên men và bã rượu khô là các sản phẩm thu được sau khi tách rượu etyl bằng cách chưng cất từ ngũ cốc hoặc hỗn hợp ngũ cốc được lên men bằng nấm men bằng các phương pháp sử dụng trong ngành chưng cất rượu từ ngũ cốc.

Cặn rượu từ việc chưng cất (ví dụ, bao gồm nước, phần bã ngũ cốc, tế bào nấm men) được tách thành phần "rắn" và phần lỏng.

Phần rắn được gọi là "đường miếng ẩm" và có thể sử dụng làm thức ăn chăn nuôi.

Phần lỏng được cho bay hơi (một phần) thành xi-rô (dung dịch tan).

Khi đường miếng ẩm được sấy khô, ta sẽ thu được bã ngũ cốc lên men (DDG).

Khi đường miếng ẩm được sấy khô cùng với xi-rô (dung dịch tan), ta thu được bã rượu khô (DDGS).

Có thể sử dụng đường miếng ẩm trong các trang trại nuôi bò sữa và trang trại nuôi bò thịt.

Có thể sử dụng DDGS trong thức ăn cho gia súc (ví dụ, bò sữa, bò thịt và lợn) và thức ăn cho gia cầm.

DDGS ngô là nguồn protein rất tốt cho bò sữa.

Bột gluten ngô

Theo một phương án, phụ phẩm của ngô có thể là bột gluten ngô (CGM).

CGM là phụ phẩm dạng bột của ngành xay xát ngô. CGM được sử dụng trong, ví dụ, thức ăn chăn nuôi. Nó có thể được sử dụng làm nguồn protein giá rẻ trong thức ăn chăn nuôi, như thức ăn cho vật nuôi làm cảnh, thức ăn gia súc và thức ăn gia cầm. Đây là nguồn axit amin xystein đặc biệt tốt, nhưng phải được cân bằng với các protein khác về lysin.

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế và/hoặc thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm này có thể được sử dụng dưới dạng phù hợp bất kỳ.

Chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng hoặc dạng khác. Ví dụ về chế phẩm rắn, bao gồm bột, bột nhão, viên tròn, viên nang, viên nhỏ, viên nén, mảnh vụn, và hạt có thể làm ướt, phun khô hoặc đông khô. Ví dụ về chế phẩm dạng lỏng bao gồm, nhưng không giới hạn, dung dịch chứa nước, dung dịch hữu cơ hoặc dung dịch hữu cơ chứa nước, huyền phù và nhũ tương. Trong một số phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được trộn với thức ăn chăn nuôi hoặc được dùng theo đường nước uống.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp chế biến chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi bao gồm bước trộn xylanaza được đề cập trong bản mô tả này với chất mang, chất pha loãng hoặc chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi, và (tùy chọn) bước đóng gói.

Hỗn hợp sơ chế

Thức ăn chăn nuôi và/hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được kết hợp với ít nhất một khoáng chất và/hoặc ít nhất một vitamin. Chế phẩm có nguồn gốc như vậy có thể được gọi là hỗn hợp sơ chế trong bản mô tả này.

Quy trình tạo mạch nha và nấu bia rượu

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym của sáng chế) có thể được sử dụng trong quy trình tạo mạch nha và nấu bia rượu.

Hạt lúa mạch chứa 1,7 đến 4,1% (khối lượng/khối lượng) chất có thể chiết xuất trong nước và 3,6 đến 6,4% (khối lượng/khối lượng) tổng beta -glucan (Anderson, M.A., Cook, J.A., & Stone, B.A., Journal of the Institute of Brewing (Tập chí Học viện về sản xuất bia), 1978, 84, 233-239; Henry, J., Journal of the Science of Food and Agriculture (Tập chí Khoa học thực phẩm và nông nghiệp), 1985, 36, 1243).

Hạt lúa mì chứa 0,1 đến 0,8% (khối lượng/khối lượng) chất có thể chiết xuất trong nước và 0,6 đến 1,4% (khối lượng/khối lượng) tổng beta -glucan (Anderson, M.A. và cộng sự (1978) *như trên*).

Việc thủy phân hiệu quả arabinoxylan (AXsol) và beta-glucan là quan trọng bởi vì các hợp chất này có thể liên quan đến các vấn đề trong sản xuất như độ nhớt của dịch đường (Ducroo, P. & Frelon, P.G., Proceedings of the European Brewery Convention Congress (Kỷ yếu Đại hội các nhà sản xuất bia châu Âu) Zurich, 1989, 445; Viëtor, R.J. & Voragen, A.G.J., Journal of the Institute of Brewing (Tập chí Học viện về sản xuất bia), 1993, 99, 243) và khả năng lọc và sự tạo sương mù (Coote, N. & Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing (Tập chí Học viện về sản xuất bia), 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. & Kanimura, M. 1991. Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling (Kỷ yếu Hội nghị Aviemore về quy trình tạo mạch nha, nấu bia và chưng cất), 1990, 427).

Sáng chế đề xuất phương pháp thủy phân arabinoxylan (ví dụ, AXinsol và AXsol) trong quy trình tạo mạch nha và nấu bia trong đó hạt lúa mì, hạt lúa mạch hoặc kết hợp của chúng, hoặc các phần của hạt lúa mì và/hoặc hạt lúa mạch, được trộn với xylanaza cải biến của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế có thể liên quan đến chế phẩm thực phẩm là đồ uống, bao gồm, nhưng không giới hạn trong đồ uống lên men như bia và rượu, bao gồm enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế có thể liên quan đến chế phẩm thực phẩm là đồ uống, bao gồm, nhưng không giới hạn trong đồ uống lên men như bia và rượu, bao gồm xylanaza cải biến theo sáng chế.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "đồ uống lên men" có nghĩa là bao gồm đồ uống bất kỳ được sản xuất bằng phương pháp bao gồm quy trình lên men, như lên men bằng vi khuẩn, như lên men bằng vi khuẩn và/hoặc nấm men.

Theo một phương án của sáng chế, đồ uống lên men là bia. Thuật ngữ "bia" có nghĩa bao gồm dịch đường lên men bất kỳ được sản xuất bằng cách lên men/nấu bia nguyên liệu thực vật chứa tinh bột. Thông thường, bia được sản xuất từ mạch nha hoặc chất phụ gia, hoặc kết hợp bất kỳ của mạch nha và chất phụ gia là nguyên liệu thực vật chứa tinh bột. Trong bản mô tả này, "mạch nha" được hiểu là ngũ cốc có mạch nha, như lúa mạch hoặc lúa mì có mạch nha.

Trong bản mô tả này, "chất phụ gia" chỉ nguyên liệu thực vật chứa đường và/hoặc tinh bột bất kỳ không phải là mạch nha, như mạch nha lúa mạch hoặc lúa mì. Ví dụ về chất phụ gia, có thể đề cập đến nguyên liệu như bột ngô thô thông thường, bột ngô thô tinh chế, nấm men xay để làm bia, gạo, cao lương, tinh bột ngô tinh chế, lúa mạch, tinh bột lúa mạch, lúa mạch đã bóc vỏ, lúa mì, tinh bột lúa mì, ngũ cốc sấy khô, vụn ngũ cốc, lúa mạch đen, yến mạch, ngô (bắp), khoai tây, bột sắn, tinh bột sắn và xi-rô, như xi-rô ngô, xi-rô đường mía, xi-rô đường mía nghịch chuyển, lúa mạch và/hoặc xi-rô lúa mì, v.v. có thể được sử dụng làm nguồn tinh bột.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dịch ngâm" chỉ huyền phù đặc chứa nước của nguyên liệu thực vật chứa đường và/hoặc tinh bột bất kỳ như mạch nha, ví dụ, bao gồm mạch nha lúa mạch xay, mạch nha xay, và/hoặc chất phụ gia khác hoặc kết hợp của chúng, sau đó được trộn với nước để được tách ra thành dịch đường và bã ngũ cốc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dịch đường" chỉ phần dung dịch chảy ra không được lên men sau khi chiết xuất mạch nha trong quá trình ủ rượu.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp chế biến đồ uống lên men như bia bao gồm bước trộn xylanaza cải biến của sáng chế với mạch nha hoặc chất phụ gia.

Ví dụ về bia bao gồm: bia mạch nha, bia nấu theo luật bia "Reinheitsgebot", bia ale, bia IPA, bia lager, bia đắng, Happoshu (bia thứ hai), bia thức ba, bia khô, bia không cồn, bia nhẹ, bia độ cồn thấp, bia có calo thấp, bia đen, bia bock, bia đen mạnh, rượu mạch nha, bia không cồn, rượu mạch nha không cồn, v.v., ngoài ra còn có các loại đồ uống từ mạch nha và ngũ cốc khác như đồ uống từ mạch nha mùi trái cây, ví dụ đồ uống từ mạch nha mùi cam quýt, như đồ uống từ mạch nha mùi chanh vỏ xanh, mùi cam, mùi chanh vỏ vàng hay mùi trái mọng, đồ uống từ mạch nha mùi rượu, ví dụ rượu mạch nha mùi vodka, rum, hay tequila, hoặc đồ uống từ mạch nha mùi cà phê, như rượu mạch nha mùi cafein, v.v.

Phá vỡ nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc, ví dụ, để sản xuất nhiên liệu sinh học

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym) có thể

được sử dụng để phá vỡ (phân giải) AXinsol và AXsol hoặc trong quá trình xử lý ngũ cốc từ nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc. Nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc có thể là ngũ cốc nguyên hạt (ví dụ, hạt lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, tiểu hắc mạch hoặc ngô hoặc hỗn hợp của chúng) hoặc các phần của ngũ cốc nguyên hạt, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym) có thể được sử dụng để phá vỡ (phân giải) AXinsol và AXsol trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc hoặc ngũ cốc nguyên hạt.

Để tránh nhầm lẫn, ngũ cốc nguyên hạt có thể được làm vỡ cơ học.

Nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc có thể được phá vỡ hoặc phân giải thành glucoza. Glucoza sau đó có thể được sử dụng làm nguyên liệu cấp cho quy trình lên men bất kỳ, ví dụ, trong sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học) và/hoặc sản xuất các chất hóa sinh (ví dụ, isopren gốc sinh học).

Nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc có thể là nguyên liệu cấp cho quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học).

Ngày nay, phần lớn etanol nhiên liệu được sản xuất từ hạt ngô (bắp), được xay hoặc nghiền, xử lý bằng enzym amylaza để thủy phân tinh bột thành đường, cho lên men, và được chưng cất. Mặc dù đã đạt được những bước tiến đáng kể trong việc giảm giá thành sản xuất etanol, vẫn còn tồn tại rất nhiều thách thức. Vẫn cần sử dụng kỹ thuật nâng cao để giảm chi phí nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học trong sản xuất etanol. Ví dụ, trong sản xuất etanol có nguồn gốc từ ngũ cốc, việc phân giải arabinoxylan có thể làm tăng khả năng tiếp cận của tinh bột.

Sáng chế đề xuất xylanaza cải biến để sử dụng làm phá vỡ hemixenluloza, ví dụ, arabinoxylan – cụ thể là AXinsol và AXsol.

Ví dụ, trong ngành công nghiệp cồn nhiên liệu châu Âu, các loại hạt ngũ cốc nhỏ như lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen là các nguyên liệu phổ biến, tại Mỹ, ngô được sử dụng là chủ yếu. Lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen chứa, sau tinh bột, polyme polysacarit không phải tinh bột (NSP) ở mức cao, như xenluloza, beta-glucan và hemixenluloza.

Tỷ lệ chiếm giữ của các NSP khác nhau là khác nhau trong từng nguyên liệu cấp. Bảng dưới đây cho biết lượng NSP khác nhau trong lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen so với các nguyên liệu cấp khác.

Bảng 1: Polysacarit không phải tinh bột có trong nguyên liệu cấp khác nhau (g kg⁻¹ chất khô)

	Ngô	Lúa mì	Lúa mạch đen	Lúa mạch		Yến mạch	
				Có vỏ	Bóc vỏ	Có vỏ	Bóc vỏ
Beta-Glucan	1	8	16	42	42	28	41
Xenluloza	22	17-20	15-16	43	10	82	14
NCP ¹ tan và không tan.	75	89-99	116-136	144	114	150	113
Tổng NSP	97	107-119	132-152	186	124	232	116

¹ Polysacarit không được tạo từ xenluloza: pentosan, (arabino)xylan và các hemixenluloza khác.

NSP có thể tạo độ nhớt cao cho dịch ngâm ngũ cốc. Độ nhớt cao có ảnh hưởng không tốt đến sản xuất etanol do nó hạn chế nồng độ chất rắn có thể được sử dụng trong bước ủ rượu và sẽ làm giảm hiệu suất năng lượng của quy trình. Ngoài ra, hemixenluloza còn lại có mặt trong toàn bộ quy trình có thể góp phần làm tắc nghẽn bộ trao đổi nhiệt và thiết bị chưng cất. Tác động lớn nhất nhìn thấy được của độ nhớt cao là khi dịch ngâm được làm mát tới nhiệt độ lên men (32°C). Điều này giải thích rằng độ nhớt cần phải được giảm trong quy trình ở giai đoạn bất kỳ trước bước làm mát.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp phân giải nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc bao gồm bước trộn xylanaza cải biến như được công bố trong bản mô tả này càng sớm càng tốt trong quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học), ví dụ tốt nhất là trong quá trình trộn nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc khi mới bắt đầu quy trình. Một ưu điểm của việc thêm xylanaza cải biến như được công bố trong bản mô tả này tại giai đoạn đầu của quy trình là các enzym sẽ phá vỡ độ nhớt ban đầu.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp phân giải nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc bao gồm bước trộn xylanaza cải biến như được công bố trong bản mô tả này trước hoặc trong quy trình hóa lỏng, quy trình đường hóa, quy trình lên men, quy trình đường hóa và lên men đồng thời, sau quy trình lên men hoặc kết hợp các quy trình này.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến bước làm giảm độ nhớt khi phân giải nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc, ví dụ như trong quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học).

Việc sử dụng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế và được đề cập đến trong bản mô tả này, để làm giảm độ nhớt khi phân giải nguyên liệu có nguồn gốc

từ hạt ngũ cốc, ví dụ trong quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học), mang tới nhiều lợi ích:

- Có thể sử dụng dịch ngâm có hàm lượng chất khô cao hơn trong quy trình
- Có thể đạt được hàm lượng chất rắn cao hơn trong xi-rô cuối
- Truyền nhiệt tốt hơn, yêu cầu ít năng lượng hơn
- Giảm tắc nghẽn máy bay hơi, dẫn tới giảm chi phí vệ sinh
- Tăng sản lượng etanol hoàn thiện
- Nâng cao chất lượng DDGS (phụ phẩm)
- Tách tốt hơn phần chất rắn và phần chất lỏng trong quá trình tách cặn rượu (sau khi chưng cất). Độ nhớt thấp hơn làm tăng hiệu quả tách.

Ưu điểm đáng kể khác của sáng chế là việc sử dụng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế, trong sản xuất nhiên liệu sinh học còn giúp nâng cao chất lượng sản phẩm (phụ phẩm) được sản sinh từ quy trình đó như đường miếng ảm, bã ngũ cốc lên men (DDG), bã rượu khô (DDGS). Do đó, một ưu điểm của sáng chế là do đường miếng ảm, DDG và DDGS là sản phẩm (phụ phẩm) của quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học (ví dụ cồn sinh học), nên việc sử dụng sáng chế sẽ giúp nâng cao chất lượng của các sản phẩm (phụ phẩm) này. Ví dụ, các arabinoxylan trong các sản phẩm (phụ phẩm) có thể đã được hòa tan trong quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học.

Tách gluten-tinh bột trong ngũ cốc (ví dụ lúa mì)

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế (hoặc chế phẩm chứa enzym) của sáng chế hoặc như đã công bố trong bản mô tả này có thể được sử dụng để phá vỡ (phân giải) AXinsol và AXsol trong quá trình tách gluten và tinh bột lúa mì.

Sau khi tách ban đầu vỏ cám và mầm lúa mì khỏi nội nhũ, áp dụng theo phương pháp công nghiệp quy trình cắt phân đoạn bột nội nhũ lúa mì thành phần cắt tinh bột và gluten trên quy mô lớn để thu được tinh bột A và phụ phẩm tinh bột B và bột gluten chất lượng cao.

Sản phẩm của việc phân giải bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì) trong sáng chế này là tinh bột (tinh bột A chất lượng cao).

Ngoài ra, phụ phẩm tinh bột B và bột gluten cũng được tạo ra. Sau đó từng sản phẩm được xử lý tiếp để bổ sung hoặc làm cải biến đặc tính thực phẩm theo nhu cầu thị trường.

Bản mô tả này mô tả một số quy trình tách lúa mì được sử dụng trong công nghiệp. Các quy trình công nghiệp này khác nhau chủ yếu ở dạng hỗn hợp nước - bột được đưa vào thiết bị cắt phân đoạn (máy ly tâm, máy tách xyclon hoặc thiết bị sàng lọc) hoặc trong điều kiện phản ứng ban đầu như nhiệt độ và việc tác dụng lực cắt (*Abdulvahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol (Công nghệ) 37 (2004) 499-515, Nghiền ướt bột lúa mì: quy trình công nghiệp và phương pháp thử nghiệm quy mô nhỏ*).

Trong phương pháp tách bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì) thành phần cất tinh bột và gluten, phương pháp bao gồm bước trộn bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì), nước và xylanaza cải biến. Bột ngũ cốc, nước và xylanaza cải biến có thể được trộn đồng thời hoặc liên tiếp. Trong một số phương án, có thể trộn bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì) và nước với nhau trước khi trộn với xylanaza cải biến.

Nhìn chung, bột ngũ cốc (ví dụ bột lúa mì) được trộn thành bột nhồi hoặc bột nhão, với hàm lượng chất rắn khô thay đổi trong khoảng từ 35 đến 63%, ở nhiệt độ ~20-45°C. Sau đó hỗn hợp được xử lý tiếp bằng cách:

- 1) để hỗn hợp nghỉ trong một thời gian (~30 phút) và liên tiếp rửa sạch tinh bột ra khỏi hỗn hợp bằng cách sử dụng thiết bị sàng lọc, máy ly tâm hoặc máy tách xyclon để tách sữa tinh bột từ gluten, hoặc
- 2) tác dụng lực cắt vào hỗn hợp, tùy chọn có thể pha loãng hỗn hợp thêm nữa và sau đó tách bột lúa mì bằng máy tách xyclon, hoặc máy ly tâm trục ngang 2 hoặc 3 pha.

Thuật ngữ "chất rắn khô" được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là tổng chất rắn (tan và không tan) của huyền phù đặc (theo %) trên cơ sở khối lượng khô.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp hoặc việc sử dụng được yêu cầu bảo hộ có thể bao gồm các bước trộn bột lúa mì để tạo bột nhồi hoặc bột nhão với hàm lượng chất rắn khô nằm trong khoảng 35-63%, ở nhiệt độ bằng khoảng 20 đến khoảng 45°C và bước tách tinh bột từ gluten.

Phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm:

- a) để hỗn hợp nghỉ trong khoảng 30 phút và liên tiếp rửa sạch tinh bột khỏi hỗn hợp bằng cách sử dụng thiết bị sàng lọc, máy ly tâm hoặc máy tách xyclon để tách sữa tinh bột từ gluten; hoặc

b) tác dụng lực cắt vào hỗn hợp, và tùy chọn có thể pha loãng hỗn hợp thêm nữa, tách tinh bột ra khỏi gluten bằng máy tách xyclon hoặc máy ly tâm trục ngang 2 hoặc 3 pha.

Sáng chế này cung cấp cách cải thiện quy trình tách tinh bột và gluten bằng cách thêm enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế một cách phù hợp trong bước pha trộn bột và nước ban đầu trong các quy trình khác nhau được mô tả như trên được sử dụng để tách tinh bột lúa mì. Việc tách được cải thiện bằng cách thêm xylanaza cải biến trong bước pha trộn ban đầu, do sự giảm độ nhớt và sự thủy phân AXsol và/hoặc AXinsol ảnh hưởng đến các hạt gluten. Bằng cách phân giải các polyoligosacarit và oligosacarit này, sự kết tụ gluten tăng lên, dẫn tới cải thiện sản lượng gluten. (S.A. Frederix, C.M. Courtin, J.A. Delcour, *J. Cereal Sci. (Tập chí Khoa học về ngũ cốc)* 40 (2004) 41-49, *Tính chọn lọc cơ chất và tính nhạy chất ức chế ảnh hưởng đến chức năng của xylanaza trong việc tách gluten-tinh bột từ bột lúa mì*).

Một ưu điểm của sáng chế là sáng chế giúp mang lại sản lượng tinh bột A cao hơn và/hoặc gluten có chất lượng tốt hơn (ví dụ bột gluten có chất lượng tốt hơn).

Một ưu điểm của sáng chế là sáng chế cải thiện việc tách gluten-tinh bột lúa mì.

Một trong các cách đánh giá chất lượng gluten là theo dõi sự kết tụ gluten. Khi tác dụng lực ma sát nhất định qua việc nhào bột hoặc trộn bột nhào, các hạt gluten có xu hướng kết tụ thành các hạt lớn hơn để tạo thành mạng polyme, được gọi là "bột gluten". Có thể thêm "bột gluten" vào thực phẩm để cải thiện tính chất của thực phẩm nướng như độ dai của bột nhồi, thời hạn sử dụng và khối lượng bánh mì (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey và C.W. Wrigley; *Wheat-gluten uses and industry needs (Sử dụng lúa mì-gluten và nhu cầu trong ngành); Trends in Food Science & Technology (Xu hướng trong Khoa học & Công nghệ thực phẩm)* 17 (2006) 82-90).

Trong ngành công nghiệp làm bánh, chất lượng và số lượng gluten trong bột lúa mì được xác định bằng xét nghiệm tiêu chuẩn ICC Số 155 (AACC 38-12) sử dụng máy Glutomatic. Trong thiết bị này, bột nhồi được tạo ra từ bột lúa mì (10,0 gr) trộn với lượng nhỏ dung dịch NaCl 2% (4,2 – 4,8 ml). Sau bước pha trộn 20 giây, bột được nhào liên tục trong khi được rửa trong 5 phút với dung dịch NaCl 2% ở nhiệt độ phòng (~22 °C), dung dịch này được bơm qua chiếc cốc trộn với lưu lượng bằng ~70 ml/phút. Trong bước rửa này, nước rửa chứa tinh bột thu được và các hạt gluten sẽ tạo viên gluten trong bộ phận sàng lọc của máy Glutomatic.

Chất lượng gluten được đo bằng cách đánh giá sự kết tụ gluten. Việc này được thực hiện bằng cách ly tâm viên gluten trong máy ly tâm đặc biệt có chứa một rây nhỏ. Các hạt gluten đi qua rây này được cân (gluten nhỏ) và tổng lượng gluten được cân. Chỉ số gluten được tính bằng $(\text{tổng gluten ướt} - \text{gluten ướt nhỏ}) / \text{tổng gluten ướt}$. Sự kết tụ gluten càng được cải thiện, phần cặn gluten nhỏ sẽ càng nhỏ hơn và giá trị chỉ số gluten càng cao hơn. Chỉ số gluten cao, với chỉ số tối đa theo lý thuyết là 100%, cho biết viên gluten có chất lượng cao.

Giá trị khác để định lượng gluten là sản lượng gluten khô (%). Giá trị này được tính bằng cách lấy số gam của tổng gluten khô chia cho tổng lượng bột khô đã được sử dụng trong thí nghiệm. Càng thu hồi được nhiều gluten khô, việc tách sẽ càng dễ dàng hơn. Xét nghiệm công nghiệp này hiện đang được điều chỉnh để mô phỏng quy trình tách bột nhồi được sử dụng trong công nghiệp.

Liều lượng

Tốt nhất là enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) với lượng nằm trong phạm vi khoảng 500 XU/kg đến khoảng 16.000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), tốt hơn là khoảng 750 XU/kg thức ăn chăn nuôi đến khoảng 8000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), tốt hơn nữa là khoảng 1500 XU/kg thức ăn chăn nuôi đến khoảng 3000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), tốt hơn nữa là khoảng 2000 XU/kg thức ăn chăn nuôi đến khoảng 2500 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 1000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) đến khoảng 4000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi).

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) với lượng lớn hơn khoảng 500 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), lớn hơn khoảng 600 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, lớn hơn khoảng 700 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, lớn hơn khoảng 800 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, lớn hơn khoảng 900 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, lớn hơn khoảng 1000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp,

lớn hơn khoảng 2000 XU/kg là phù hợp, lớn hơn khoảng 2500 XU/kg là phù hợp, lớn hơn khoảng 3000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp,

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) có hàm lượng nằm trong khoảng 2000 XU/kg đến khoảng 2500 XU/kg.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) với lượng nhỏ hơn khoảng 16.000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi), nhỏ hơn khoảng 8000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 7000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 6000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 5000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 4000 XU/kg nguyên liệu chứa xylan (ví dụ thức ăn chăn nuôi) là phù hợp.

Tốt nhất là enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể có mặt trong chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng nằm trong phạm vi khoảng 100 XU/g đến khoảng 320.000 XU/g chế phẩm, tốt hơn là khoảng 300 XU/g đến khoảng 160.000 XU/g chế phẩm, và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 500 XU/g chế phẩm đến khoảng 50.000 XU/g chế phẩm, và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 500 XU/g chế phẩm đến khoảng 40.000 XU/g chế phẩm.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng lớn hơn khoảng 100 XU/g chế phẩm, lớn hơn khoảng 200 XU/g chế phẩm là phù hợp, lớn hơn khoảng 300 XU/g chế phẩm là phù hợp, lớn hơn khoảng 400 XU/g chế phẩm là phù hợp, lớn hơn khoảng 500 XU/g chế phẩm là phù hợp.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi với lượng nhỏ hơn khoảng 320.000 XU/g chế phẩm, nhỏ hơn khoảng 160.000 XU/g chế phẩm là phù hợp, nhỏ

hơn khoảng 50.000 XU/g chế phẩm là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 40.000 XU/g chế phẩm là phù hợp, nhỏ hơn khoảng 30000 XU/g chế phẩm là phù hợp.

Hoạt tính xylanaza có thể được biểu hiện trong các đơn vị xylanaza (XU) được đo tại pH 5,0 với arabinoxylan AZCL (arabinoxylan lúa mì liên kết ngang với azurine, ví dụ viên Xylazyme, Megazyme) làm cơ chất. Sự thủy phân bởi *endo*-(1-4)- β -D-xylanaza (xylanaza) tạo ra các phân đoạn được nhuộm màu tan trong nước, và tỷ lệ giải phóng các phân đoạn này (tăng khả năng hấp thụ tại 590 nm) có thể liên quan trực tiếp đến hoạt tính enzym. Các đơn vị xylanaza (XU) được xác định theo tiêu chuẩn enzym (Danisco Xylanaza, có tại Danisco Animal Nutrition) ở điều kiện phản ứng tiêu chuẩn là 40°C, thời gian phản ứng là 5 phút trong dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0.

Hoạt tính xylanaza của enzym tiêu chuẩn được xác định là số lượng nhóm cuối mạch của đường khử được giải phóng từ cơ chất xylan từ yến mạch và lúa mì spenta trong mỗi phút trong điều kiện pH 5,3 và nhiệt độ 50°C. Nhóm cuối mạch của đường khử phản ứng với axit 3, 5-Dinitrosalicylic và sự hình thành sản phẩm phản ứng có thể được đo lường khi có sự tăng khả năng hấp thụ tại 540 nm. Hoạt tính enzym được định lượng theo đường cong chuẩn xyloza (đương lượng đường khử). Một đơn vị xylanaza (XU) là lượng enzym tiêu chuẩn giải phóng 0,5 μ mol đương lượng đường khử trong mỗi phút tại pH 5,3 và 50°C.

Theo một phương án, enzym được phân loại một cách thích hợp bằng cách sử dụng phân loại E.C. như trên, và phân loại E.C. sẽ chỉ định enzym có hoạt tính đó khi được thử nghiệm trong xét nghiệm được đề cập trong bản mô tả này để xác định 1 XU.

Tốt hơn là enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có mặt trong bước trộn của quy trình tách tinh bột lúa mì trong bột nhồi hoặc bột nhào với lượng nằm trong phạm vi bằng khoảng 10 mg/kg (0,01 kg/MT) DS bột nhồi hoặc bột nhào đến khoảng 600 mg/kg (0,60 kg/MT) DS, tốt hơn là khoảng 50 mg/kg (0,05 kg/MT) DS đến khoảng 45 mg/kg (0,45 kg/MT) DS bột nhồi hoặc bột nhào, và tốt hơn nữa là khoảng 100 mg/kg (0,10 kg/MT) DS đến khoảng 250 mg/kg (0,25 kg/MT) DS bột nhồi hoặc bột nhào.

Trong một số phương án (cụ thể là theo phương án tách tinh bột lúa mì), enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được định lượng trong phạm vi khoảng 0,019 mg/kg DS bột lúa mì (tương đương với 0,019 g protein/MT DS) đến

khoảng 119 mg/kg DS bột lúa mì (tương đương với 119 g protein/MT DS) – trong đó DS có nghĩa là hàm lượng chất rắn khô và MT nghĩa là tấn.

Trong một số phương án (cụ thể là theo phương án tách tinh bột lúa mì), enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được định lượng vào khoảng 1,19 mg/kg DS bột lúa mì (tương đương với khoảng 1,19 g protein/MT DS) – trong đó DS có nghĩa là hàm lượng chất rắn khô và MT nghĩa là tấn.

Trong một số phương án (cụ thể là theo phương án tách tinh bột lúa mì), enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được định lượng trong phạm vi từ khoảng 9 đến khoảng 120000 đơn vị/kg bột lúa mì, thích hợp hơn là trong khoảng 900-1200 đơn vị/kg bột lúa mì (trong đó 1 đơn vị được xác định là lượng enzym yêu cầu để tạo ra 1 micromol đương lượng đường khử xyloza trong mỗi phút trong điều kiện của xét nghiệm gỗ bulô của Ví dụ 4).

Trong một số phương án (cụ thể là phương án phân giải nguyên liệu có nguồn gốc ngũ cốc), enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được định lượng trong phạm vi từ khoảng 0,29 g protein/MT DS lúa mì (tương đương với 0,29 mg/kg DS) đến khoảng 0290 g/protein/MT DS lúa mì (tương đương với 290 mg/kg DS).

Trong một số phương án (cụ thể là theo phương án phân giải nguyên liệu có nguồn gốc ngũ cốc), có thể định lượng xylanaza ở mức 2,9 g/protein/MT DS lúa mì (tương đương với 2,9mg/kg DS).

Trong một số phương án (cụ thể là theo phương án phân giải nguyên liệu có nguồn gốc ngũ cốc), có thể định lượng xylanaza trong phạm vi từ khoảng 22 đến 285000 đơn vị/kg, thích hợp là khoảng 1100 đến khoảng 5700 đơn vị/kg, thích hợp là khoảng 2200 đến khoảng 2850 đơn vị/kg (trong đó 1 đơn vị được xác định là lượng enzym yêu cầu để tạo ra 1 micromol đương lượng đường khử xyloza trong mỗi phút trong điều kiện của xét nghiệm gỗ bulô của Ví dụ 4).

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế và/hoặc chế phẩm bao gồm enzym theo sáng chế có thể được chế tạo để định lượng sử dụng một lần hoặc có thể được chế tạo để sử dụng (ví dụ chăn nuôi) hàng ngày.

Lượng enzym tối ưu có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế và/hoặc chế phẩm có chứa enzym được sử dụng trong sáng chế này sẽ phụ thuộc vào sản phẩm được xử lý và/hoặc phương pháp cho sản phẩm tiếp xúc với chế phẩm và/hoặc mục đích sử dụng sản phẩm.

Lượng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế được sử dụng trong chế phẩm phải là một lượng đủ để có hiệu quả.

Lượng enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế được sử dụng trong chế phẩm phải là một lượng đủ để có hiệu quả và để duy trì đủ hiệu quả, ví dụ, trong việc cải thiện hiệu quả thức ăn chăn nuôi có chứa chế phẩm đã nêu. Khoảng thời gian hiệu quả này phải kéo dài ít nhất đến thời gian sử dụng sản phẩm (ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn cho gia súc có chứa chế phẩm này).

Công thức điều chế

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể có công thức tạo thành dạng chất lỏng, viên hoặc bột khô.

Có thể điều chế viên hoặc bột khô bằng các phương tiện được các chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến, như trong thiết bị phun phủ từ trên xuống kiểu tầng sôi, trong quy trình Wurster phun từ dưới lên hoặc tạo viên bằng thùng quay (ví dụ tạo viên bằng tốc độ dịch chuyển cao), sự ép trôi, bao phủ trong lòng chảo hoặc trong máy trộn vi hợp phần.

Trong một số phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được bao phủ, ví dụ được bọc trong nang.

Theo một phương án, lớp bao phủ sẽ bảo vệ enzym cải biến không bị tác động từ nhiệt và được xem là chất bảo vệ nhiệt.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có công thức dạng hạt hoặc bột khô như đã mô tả trong WO2007/044968 (được gọi là hạt TPT) hoặc WO1997/016076 hoặc WO1992/012645 (được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn).

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể có công thức dạng hạt cho chế phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm: lõi; chất hoạt tính; và ít nhất một lớp phủ, chất hoạt tính của viên giữ lại ít nhất 50% hoạt tính, ít nhất 60% hoạt tính, ít

nhất 70% hoạt tính, ít nhất 80% hoạt tính sau khi xử lý trong các điều kiện được chọn từ một hoặc nhiều trong số a) quy trình tạo viên thức ăn chăn nuôi, b) quy trình tiền xử lý thức ăn chăn nuôi được làm nóng bằng hơi, c) bảo quản, d) bảo quản dưới dạng một thành phần trong hỗn hợp chưa được tạo viên, và e) bảo quản dưới dạng một thành phần trong hỗn hợp cơ sở thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp sơ chế thức ăn chăn nuôi bao gồm ít nhất một hợp chất được chọn từ khoáng vi lượng, axit hữu cơ, đường khử, vitamin, cholin clorua, và các hợp chất mang đến hỗn hợp cơ sở thức ăn chăn nuôi hoặc hỗn hợp sơ chế thức ăn chăn nuôi có tính bazơ hoặc axit.

Đối với hạt có ít nhất một lớp phủ có thể bao gồm nguyên liệu hydrat hóa hút ẩm tạo thành ít nhất 55% (w/w) hạt; và/hoặc ít nhất một lớp phủ có thể bao gồm hai lớp phủ. Hai lớp phủ có thể là lớp phủ hydrat hóa hút ẩm và lớp phủ chắn hơi ẩm. Trong một số phương án, lớp phủ hydrat hóa hút ẩm có thể nằm trong khoảng 25% và 60% (w/w) hạt và lớp phủ chắn ẩm có thể nằm trong khoảng giữa 2% và 15% (w/w) hạt. Lớp phủ hydrat hóa hút ẩm có thể được chọn từ muối vô cơ, sucroza, tinh bột và maltodextrin và lớp phủ chắn ẩm có thể được chọn từ polyme, gôm, nước sữa và tinh bột.

Có thể tạo hạt bằng quy trình tạo viên thức ăn chăn nuôi và có thể thực hiện quy trình tiền xử lý thức ăn chăn nuôi trong khoảng thời gian lên đến vài phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng 70°C và 95°C, như nhiệt độ nằm trong khoảng 85°C và 95°C.

Theo một phương án, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể có công thức điều chế dạng viên cho chế phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm: lõi; chất hoạt tính, chất hoạt tính của hạt giữ lại ít nhất 80% hoạt tính sau khi bảo quản và sau quy trình tạo viên được làm nóng bằng hơi trong đó hạt là một thành phần; lớp phủ chắn ẩm; và lớp phủ hydrat hóa hút ẩm ít nhất bằng 25% (w/w) hạt, hạt có hoạt độ nước nhỏ hơn 0,5 trước quy trình tạo viên được làm nóng bằng hơi.

Hạt có thể có lớp phủ chắn ẩm được chọn từ polyme và gôm và nguyên liệu hydrat hóa hút ẩm có thể là muối vô cơ. Lớp phủ hydrat hóa hút ẩm có thể bằng khoảng giữa 25% và 45% (w/w) hạt và lớp phủ chắn ẩm có thể bằng khoảng giữa 2% và 10% (w/w) hạt.

Có thể tạo hạt bằng quy trình tạo viên được làm nóng bằng hơi có thể được thực hiện trong khoảng thời gian lên đến vài phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng 85°C và 95°C.

Trong một số phương án, có thể pha loãng enzym bằng chất pha loãng, như tinh bột, đá vôi hoặc tương tự.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế hoặc chế phẩm chứa enzym ở dạng chế phẩm lỏng thích hợp cho sự tiêu dùng, tốt nhất là sự tiêu dùng chất lỏng này chứa một hoặc nhiều thành phần sau: dung dịch đậm, muối, sorbitol và/hoặc glyxerol.

Theo phương án khác, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế hoặc chế phẩm chứa enzym có thể được điều chế bằng cách cho, ví dụ phun xịt, enzym lên cơ chất chất mang, ví dụ như lúa mì nghiền.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế hoặc chế phẩm chứa enzym theo sáng chế có thể được điều chế dưới dạng hỗn hợp sơ chế. Ví dụ, hỗn hợp sơ chế có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần thức ăn chăn nuôi, như một hoặc nhiều khoáng chất và/hoặc một hoặc nhiều vitamin.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó, để sử dụng trong sáng chế được điều chế với ít nhất một chất mang được chấp nhận về sinh lý học được chọn từ ít nhất một trong các thành phần maltodextrin, đá vôi (canxi cacbonat), xyclodextrin, lúa mì hoặc thành phần lúa mì, sucroza, tinh bột, Na_2SO_4 , hoạt thạch, PVA, sorbitol, benzoat, sorbate, glyxerol, sucroza, propylen glycol, 1,3-propane diol, glucoza, paraben, natri clorua, xitrat, axetat, phosphat, canxi, metabisulfit, format và hỗn hợp của chúng.

Đóng gói

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế và/hoặc chế phẩm chứa enzym này (ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi) và/hoặc hỗn hợp sơ chế và/hoặc thức ăn chăn nuôi theo sáng chế được đóng gói.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi và/hoặc hỗn hợp sơ chế và/hoặc thức ăn chăn nuôi được đóng gói trong bao, như bao giấy.

Theo phương án khác, chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi và/hoặc hỗn hợp sơ chế và/hoặc thức ăn chăn nuôi có thể được đóng kín trong dụng cụ chứa. Có thể sử dụng bất kỳ dụng cụ chứa nào phù hợp.

Các dạng chế phẩm

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế hoặc chế phẩm chứa enzym (ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi) của sáng chế và các thành phần khác và/hoặc thức ăn chăn nuôi có chứa enzym này có thể được sử dụng dưới bất kỳ dạng phù hợp nào.

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế hoặc chế phẩm chứa enzym (ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi) của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm rắn hoặc lỏng hoặc dạng khác. Ví dụ về chế phẩm rắn bao gồm bột, bột nhão, viên tròn, viên nang, viên nhỏ, viên nén, viên được bao phủ, viên nang, noãn, dung dịch hoặc huyền phù, mảnh vụn, và hạt có thể là dạng có thể thấm nước, phun khô hoặc đông khô. Ví dụ về chế phẩm dạng lỏng bao gồm, nhưng không giới hạn, dung dịch chứa nước, dung dịch hữu cơ hoặc dung dịch hữu cơ chứa nước, huyền phù và nhũ tương.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể chứa chất tạo hương vị hoặc tạo màu, sử dụng cho tác dụng tức thì, tác dụng trì hoãn, tác dụng cải biến, tác dụng duy trì liên tục, tác dụng xung hoặc tác dụng giải phóng có kiểm soát. Ví dụ, nếu chế phẩm của sáng chế được sử dụng ở thể rắn, ví dụ dạng viên, nó cũng có thể chứa một hoặc nhiều trong số các thành phần sau: tá dược như xenluloza vi tinh thể, lactoza, natri xitrat, canxi cacbonat, điaxit canxi phosphat và glyxin; chất rải như tinh bột (tốt nhất là tinh bột bắp, khoai tây hoặc tinh bột sắn), glycollate tinh bột natri, natri croscarmellose và silicat phức nhất định; chất kết dính tạo hạt như polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, gelatin và acacia; chất bôi trơn như magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat và hoạt thạch.

Ví dụ về chất mang được chấp nhận về mặt dinh dưỡng để sử dụng trong điều chế các dạng bao gồm, ví dụ, nước, dung dịch muối, rượu, silicon, sáp, vazolin, dầu thực vật, polyetylen glycol, propylen glycol, hạt mỡ, đường, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, hoạt thạch, chất hoạt động bề mặt, axit silixic, parafin nhớt, dầu thơm, monoglyxerit axit béo và diglyceride, este axit béo petroethral, hydroxymetyl-xenluloza, polyvinylpyrrolidone và tương tự.

Tá dược ưu tiên dành cho các dạng chế phẩm bao gồm lactoza, tinh bột, xenluloza, đường sữa hoặc polyetylen glycol có khối lượng phân tử cao.

Đối với huyền phù chứa nước và/hoặc rượu thuốc, chế phẩm của sáng chế có thể kết hợp với chất tạo ngọt hoặc chất tạo hương vị khác nhau, chất tạo màu hoặc thuốc

nhuộm với chất nhuộm hóa và/hoặc chất tạo huyền phù và với chất pha loãng như nước, propylen glycol và glyxerin và các kết hợp của chúng với nhau.

Đối tượng

Thuật ngữ "đối tượng", được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ động vật sẽ hoặc đã được sử dụng xylanaza cải biến theo sáng chế hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế hoặc thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi này theo sáng chế.

Thuật ngữ "đối tượng", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ động vật.

Theo một phương án, đối tượng là động vật có vú, chim, cá hoặc loài giáp xác bao gồm, ví dụ, vật nuôi hoặc động vật thuần hóa (ví dụ thú cưng).

Theo một phương án, "đối tượng" là vật nuôi.

Thuật ngữ "vật nuôi", như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến động vật được chăn nuôi bất kỳ. Tốt nhất, vật nuôi là một hoặc nhiều động vật nhai lại như gia súc (ví dụ bò cái hoặc bò đực (bao gồm bê con)), động vật dạ dày đơn như gia cầm (bao gồm gà thịt, gà giò và gà tây), lợn (bao gồm lợn con), chim, động vật sống dưới nước như cá, cá không có dạ dày, cá có dạ dày, cá nước ngọt như cá hồi, cá tuyết, cá hồi vân và cá chép, ví dụ cá chép Nhật Bản, cá biển như cá mú, và động vật giáp xác như tôm, trai và sò), ngựa (bao gồm ngựa đua), cừu (bao gồm cừu con).

Theo phương án khác, "đối tượng" là động vật thuần hóa hoặc thú cưng hoặc động vật được bảo tồn trong môi trường vườn bách thú.

Thuật ngữ "động vật thuần hóa hoặc thú cưng hoặc động vật được bảo tồn trong môi trường vườn bách thú" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến động vật bất kỳ liên quan bao gồm họ chó (ví dụ chó), họ mèo (ví dụ mèo), loài gặm nhấm (ví dụ chuột lang, chuột nhắt, chuột cống), chim, cá (bao gồm cá nước ngọt và cá biển), và ngựa.

Hiệu quả

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "hiệu quả chăn nuôi" có thể được xác định bằng hiệu quả của thức ăn chăn nuôi và/hoặc sự tăng trọng của vật nuôi và/hoặc bằng tỷ lệ chuyển hóa thức ăn chăn nuôi và/hoặc bằng sự tiêu hóa đường chất trong thức ăn (ví dụ sự tiêu hóa axit amin) và/hoặc năng lượng tiêu hóa hoặc năng lượng trao đổi trong thức ăn và/hoặc bằng sự duy trì nitơ và/hoặc bằng khả năng tránh được các ảnh hưởng tiêu cực của bệnh viêm ruột hoại tử ở vật nuôi và/hoặc phản ứng miễn dịch của đối tượng.

Tốt nhất là "hiệu quả chăn nuôi" được xác định bằng hiệu quả thức ăn chăn nuôi và/hoặc sự tăng trọng của vật nuôi và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn.

"Hiệu quả chăn nuôi được cải thiện" nghĩa là hiệu quả thức ăn chăn nuôi tăng, và/hoặc sự tăng trọng tăng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn giảm và/hoặc sự tiêu hóa đường chất hoặc năng lượng trong thức ăn được cải thiện và/hoặc sự duy trì nitơ được cải thiện và/hoặc phản ứng miễn dịch được cải thiện ở đối tượng do sử dụng chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế trong thức ăn chăn nuôi so với thức ăn chăn nuôi không chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi này.

Tốt nhất, "hiệu quả chăn nuôi được cải thiện" nghĩa là hiệu quả thức ăn chăn nuôi tăng và/hoặc sự tăng trọng tăng và/hoặc tỷ lệ chuyển hóa thức ăn giảm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hiệu quả thức ăn chăn nuôi" chỉ khối lượng tăng trọng đạt được trên mỗi đơn vị thức ăn khi vật nuôi được cho ăn theo nhu cầu hoặc cho ăn một lượng thức ăn xác định trong một khoảng thời gian.

"Hiệu quả thức ăn chăn nuôi tăng" nghĩa là việc sử dụng chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế trong thức ăn chăn nuôi mang đến kết quả là trọng lượng đạt được tăng theo mỗi đơn vị thức ăn được hấp thụ so với thức ăn chăn nuôi không có phụ gia thức ăn chăn nuôi này.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn (FCR)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tỷ lệ chuyển hóa thức ăn" chỉ lượng thức ăn cho vật nuôi để tăng trọng lượng vật nuôi theo một lượng xác định.

Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được cải thiện nghĩa là tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp hơn.

"Tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp hơn" hoặc "tỷ lệ chuyển hóa thức ăn được cải thiện" nghĩa là việc sử dụng chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi trong thức ăn dẫn đến lượng thức ăn cần thiết để vật nuôi tăng trọng thấp hơn một lượng xác định so với lượng thức ăn cần thiết để tăng cùng trọng lượng khi sử dụng thức ăn không chứa chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi.

Tiêu hóa đường chất

Tiêu hóa đường chất được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là phân dưỡng chất tiêu biến khỏi đường dạ dày ruột hoặc một đoạn dạ dày ruột xác định, ví dụ, ruột non. Sự tiêu hóa đường chất có thể được đo bằng sự khác nhau giữa thành phần mà đối tượng nạp vào và thành phần đi ra trong phân của đối tượng, hoặc giữa thành phần đối

tượng nạp vào và thành phần còn lại trong phần thức ăn được tiêu hóa trên một đoạn dạ dày ruột xác định, ví dụ ruột hồi.

Sự tiêu hóa dưỡng chất như được sử dụng trong bản mô tả này có thể được đo bằng sự khác nhau giữa sự nạp vào dưỡng chất và sự bài tiết dưỡng chất bằng phương pháp thu thập toàn bộ phân trong một khoảng thời gian; hoặc với việc sử dụng chất đánh dấu tro không bị động vật hấp thụ, và cho phép các nhà nghiên cứu tính toán lượng dưỡng chất đã tiêu hóa trong toàn bộ đường dạ dày ruột hoặc một đoạn dạ dày ruột. Chất đánh dấu tro này có thể là titan đioxit, crom (III) oxit hoặc tro không tan trong axit. Sự tiêu hóa có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm dưỡng chất trong thức ăn chăn nuôi, hoặc dưới dạng đơn vị khối lượng dưỡng chất được tiêu hóa trên đơn vị khối lượng dưỡng chất trong thức ăn.

Sự tiêu hóa dưỡng chất được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm sự tiêu hóa tinh bột, tiêu hóa chất béo, tiêu hóa protein, và tiêu hóa axit amin.

Sự tiêu hóa năng lượng được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là tổng năng lượng thức ăn đã tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng phân hoặc tổng năng lượng thức ăn đã tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng phần thức ăn được tiêu hóa còn lại trên đoạn dạ dày ruột xác định của vật nuôi, ví dụ ruột hồi. Năng lượng trao đổi chất được sử dụng trong bản mô tả này chỉ năng lượng trao đổi biểu kiến và là tổng năng lượng thức ăn đã tiêu thụ trừ đi tổng năng lượng có trong phân, nước tiểu và sản phẩm khí của sự tiêu hóa. Sự tiêu hóa năng lượng và năng lượng trao đổi có thể được đo bằng sự khác nhau giữa tổng tăng lượng nạp vào và tổng năng lượng được bài tiết trong phân hoặc phần thức ăn được tiêu hóa có trong đoạn dạ dày ruột xác định, bằng cách sử dụng phương pháp tương tự để đo lường sự tiêu hóa dưỡng chất, với việc điều chỉnh bài tiết nitơ thích hợp để tính năng lượng trao đổi của thức ăn.

Kết hợp với các thành phần khác

Enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các thành phần khác.

Theo một phương án, enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với probiotic (vi khuẩn có ích) hoặc vi sinh vật được cho ăn trực tiếp (DFM), ví dụ vi khuẩn được cho ăn trực tiếp.

Tổ hợp của sáng chế bao gồm enzym có hoạt tính xylanaza, ví dụ enzym xylanaza GH10 (như enzym xylanaza GH10 cải biến) hoặc phân đoạn của nó của sáng

chế hoặc chế phẩm chứa xylanaza, ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, và thành phần khác thích hợp cho sự hấp thu ở người hoặc động vật và có thể mang đến lợi ích về sức khỏe hoặc sinh lý học cho đối tượng tiêu dùng.

Theo một phương án, "thành phần khác" có thể là một hoặc nhiều enzym khác (ví dụ, enzym thức ăn chăn nuôi khác hoặc enzym trong sản xuất rượu bia hoặc mạch nha, hoặc enzym xử lý hạt hoặc enzym tách tinh bột-gluten lúa mì).

Enzym bổ sung thích hợp để sử dụng trong sáng chế này có thể là một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm: endoglucanase (E.C. 3.2.1.4); celliobiohydrolase (E.C. 3.2.1.91), β -glucosidaza (E.C. 3.2.1.21), xenlulaza (E.C. 3.2.1.74), lichenase (E.C. 3.1.1.73), lipaza (E.C. 3.1.1.3), lipit acyltransferase (thường được phân loại là E.C. 2.3.1.x), phospholipaza (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 hoặc E.C. 3.1.1.5), phytaza (ví dụ 6-phytaza (E.C. 3.1.3.26) hoặc 3-phytaza (E.C. 3.1.3.8), amylaza, alpha-amylaza (E.C. 3.2.1.1), xylanaza khác (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), glucoamylaza (E.C. 3.2.1.3), hemixenlulaza, proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62) hoặc bacillolysin (E.C. 3.4.24.28) hoặc serin proteaza kiềm (E.C. 3.4.21.x) hoặc keratinase (E.C. 3.4.x.x)), enzym khử nhánh, cutinase, esteraza và/hoặc mannanase (ví dụ β -mannanase (E.C. 3.2.1.78)).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm amylaza (bao gồm α -amylaza (E.C. 3.2.1.1), amylaza tạo G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amylaza (E.C. 3.2.1.2) và γ -amylaza (E.C. 3.2.1.3)); và/hoặc proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62) hoặc bacillolysin (E.C. 3.4.24.28) hoặc serin proteaza kiềm (E.C. 3.4.21.x) hoặc keratinase (E.C. 3.4.x.x)) và/hoặc phytaza (ví dụ 6-phytaza (E.C.3.1.3.26) hoặc 3-phytaza (E.C. 3.1.3.8)).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là

tổ hợp amylaza (ví dụ α -amylaza (E.C. 3.2.1.1)) và proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62)).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là β -glucanase, ví dụ endo-1,3(4)- β -glucanase (E.C. 3.2.1.6).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là phytaza (ví dụ 6-phytaza (E.C.3.1.3.26) hoặc 3-phytaza (E.C. 3.1.3.8)).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là mannanase (ví dụ β -mannanase (E.C. 3.2.1.78)).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là lipaza (E.C. 3.1.1.3), lipit acyltransferase (thường được phân loại là E.C. 2.3.1.x) hoặc phospholipaza (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 hoặc E.C. 3.1.1.5), thích hợp là lipaza (E.C. 3.1.1.3).

Theo một phương án (cụ thể dành cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi), thành phần khác có thể là proteaza (ví dụ subtilisin (E.C. 3.4.21.62) hoặc bacillolysin (E.C. 3.4.24.28) hoặc serin proteaza kiềm (E.C. 3.4.21.x) hoặc keratinase (E.C. 3.4.x.x)).

Theo một phương án, thành phần bổ sung có thể là chất ổn định hoặc chất nhũ tương hoặc chất kết dính hoặc chất mang hoặc tá dược hoặc chất pha loãng hoặc chất rải.

Thuật ngữ "chất ổn định" được sử dụng ở đây được định nghĩa là thành phần hoặc tổ hợp các thành phần giữ cho sản phẩm (ví dụ sản phẩm thức ăn chăn nuôi) không biến đổi theo thời gian.

Thuật ngữ "chất nhũ hóa" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ thành phần (ví dụ thành phần thức ăn chăn nuôi) ngăn chặn việc tách nhũ tương. Nhũ tương là hai chất không thể trộn lẫn vào nhau, một chất hiện diện ở dạng giọt nhỏ nằm trong chất kia. Nhũ tương có thể bao gồm dầu trong nước, trong đó giọt nhỏ hoặc pha phân tán là dầu và pha liên tục là nước; hoặc nước trong dầu, trong đó nước trở thành pha phân tán và pha liên tục là dầu. Bọt, là khí trong chất lỏng, và huyền phù, là chất rắn trong chất lỏng, cũng có thể được ổn định bằng cách sử dụng chất nhũ hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất kết dính" chỉ thành phần (ví dụ thành phần thức ăn chăn nuôi) liên kết sản phẩm với nhau thông qua phản ứng vật lý hoặc hóa học. Ví dụ trong quá trình "đông cứng", nước được hấp thụ, mang đến hiệu quả kết dính. Tuy nhiên, chất kết dính có thể hấp thụ các chất lỏng khác, như dầu, giữ lại các chất lỏng đó trong nó. Trong ngữ cảnh của sáng chế này, chất kết dính thường được sử dụng trong chất rắn hoặc sản phẩm có độ ẩm thấp, ví dụ sản phẩm nướng: bánh ngọt, bánh rán, bánh mì và các sản phẩm khác. Ví dụ về chất kết dính tạo hạt bao gồm một hoặc nhiều trong số các chất sau: polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, maltoza, gelatin và acacia.

"Chất mang" nghĩa là các nguyên liệu thích hợp cho việc sử dụng enzym và bao gồm bất kỳ nguyên liệu nào như vậy được biết đến trong lĩnh vực này như, ví dụ, chất

lỏng, gel, dung môi, chất pha loãng ở thể lỏng, chất hòa tan bất kỳ hoặc tương tự không gây độc hại và không tương tác với thành phần bất kỳ của chế phẩm một cách có hại.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm (ví dụ chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi) bao gồm bước trộn enzym của sáng chế với ít nhất một chất mang được chấp nhận về sinh lý học được chọn từ ít nhất một trong các thành phần maltodextrin, đá vôi, (canxi cacbonat), xyclodextrin, lúa mì hoặc thành phần lúa mì, sucroza, tinh bột, Na_2SO_4 , hoạt thạch, PVA, sorbitol, benzoat, sorbate, glyxerol, sucroza, propylen glycol, 1,3-propan diol, glucoza, paraben, natri clorua, xitrat, axetat, phosphat, canxi, metabisulfit, format và hỗn hợp của chúng.

Ví dụ về "tá dược" bao gồm một hoặc nhiều chất trong số các chất sau: xenluloza vi tinh thể và xenluloza khác, lactoza, natri xitrat, canxi cacbonat, điaxit canxi phosphat, glyxin, tinh bột, đường sữa và polyetylen glycol có khối lượng phân tử cao.

Ví dụ về "chất rã" bao gồm một hoặc nhiều chất trong số các chất sau: tinh bột (tốt nhất là tinh bột bắp, khoai tây hoặc tinh bột sắn), glycollate tinh bột natri, natri croscarmellose và silicat phức nhất định.

Ví dụ về "chất pha loãng" bao gồm một hoặc nhiều chất trong số các chất sau: nước, etanol, propylen glycol và glyxerin, và các kết hợp của chúng với nhau.

Có thể sử dụng đồng thời các thành phần khác (ví dụ khi chúng được trộn với nhau hoặc ngay cả khi chúng được cung cấp bằng đường dùng khác) hoặc sử dụng một cách tuần tự (ví dụ chúng có thể được cung cấp bằng đường dùng khác) với xylanaza của sáng chế.

Tốt nhất là khi chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế được trộn với thành phần khác, DFM vẫn có thể tồn tại.

Theo một phương án, tốt nhất là chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không bao gồm crom hoặc crom hữu cơ

Theo một phương án, tốt nhất là chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không chứa glucanase.

Theo một phương án, tốt nhất là chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế không chứa axit sorbic.

Phân lập

Theo một phương án, tốt nhất là chuỗi axit amin, hoặc axit nucleic, hoặc enzym theo sáng chế ở dạng phân lập. Thuật ngữ "phân lập" nghĩa là chuỗi hoặc enzym hoặc axit nucleic ít nhất về cơ bản được tách khỏi ít nhất một thành phần khác liên kết tự nhiên với chuỗi, enzym hoặc axit nucleic trong tự nhiên và như được tìm thấy trong tự

nhiên. Chuỗi, enzym hoặc axit nucleic của sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng về cơ bản không có một hoặc nhiều chất nhiễm bản mà chất có thể liên kết. Vì vậy, ví dụ, về cơ bản nó có thể không có một hay nhiều polypeptit và/hoặc phân tử axit nucleic có khả năng gây nhiễm bản.

Tinh chế

Theo một phương án, tốt nhất là chuỗi, enzym hoặc axit nucleic theo sáng chế ở dạng được tinh chế. Thuật ngữ "tinh chế" nghĩa là thành phần đã cho có mặt ở mức cao. Tốt nhất thành phần là thành phần chiếm ưu thế có mặt trong chế phẩm. Tốt nhất là thành phần hiện diện ở mức ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% hoặc ít nhất khoảng 98%, mức đã nêu được xác định trên cơ sở khối lượng khô/khối lượng khô theo toàn bộ chế phẩm đang được xem xét.

Trình tự nucleotit

Phạm vi của sáng chế bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein có các tính chất đặc hiệu như được xác định trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "trình tự nucleotit" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến trình tự oligonucleotit hoặc trình tự polynucleotit, và biến thể, chất đồng đẳng, phân đoạn và dẫn xuất của chúng (như các phần của chúng). Trình tự nucleotit có thể có nguồn gốc từ bộ gen hoặc tổng hợp hoặc tái tổ hợp, có thể là sợi kép hoặc sợi đơn dù thể hiện là sợi mã hóa hoặc đối mã.

Thuật ngữ "trình tự nucleotit" liên quan đến sáng chế bao gồm ADN của bộ gen, ADN bổ sung, ADN tổng hợp và ARN. Tốt nhất nó là ADN, tốt hơn nữa là trình tự ADN bổ sung mã hóa cho sáng chế.

Theo một phương án, thuật ngữ "trình tự nucleotit" chỉ ADN bổ sung.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit khi liên quan đến và khi thuộc chính phạm vi của sáng chế không bao gồm trình tự nucleotit tự nhiên theo sáng chế khi ở môi trường tự nhiên của nó và khi liên kết với trình tự liên kết tự nhiên của nó cũng ở trong môi trường tự nhiên. Để dễ dàng tham khảo, chúng tôi sẽ gọi phương án ưu tiên này là "trình tự nucleotit không tự nhiên". Về vấn đề này, thuật ngữ "trình tự nucleotit tự nhiên" nghĩa là toàn bộ trình tự nucleotit trong môi trường tự nhiên của nó và khi liên kết thực tế với toàn bộ vùng khởi động mà nó liên kết tự nhiên, vùng khởi động đó cũng nằm trong môi trường tự nhiên của nó. Tuy nhiên, trình tự axit amin thuộc phạm vi của sáng chế có thể là biểu hiện của trình tự nucleotit sau khi được phân lập và/hoặc tinh chế trong sinh vật tự nhiên của nó. Tuy nhiên, tốt hơn hết là trình tự

axit amin thuộc phạm vi của sáng chế có thể được biểu hiện bởi trình tự nucleotit trong sinh vật tự nhiên nhưng trong đó trình tự nucleotit không thuộc sự kiểm soát của vùng khởi động mà nó liên kết tự nhiên bên trong sinh vật đó.

Thông thường, trình tự nucleotit thuộc phạm vi của sáng chế được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp (tức là ADN tái tổ hợp). Tuy nhiên, theo phương án khác của sáng chế, trình tự nucleotit có thể được tổng hợp, toàn bộ hoặc một phần, bằng cách sử dụng phương pháp hóa học được biết đến trong lĩnh vực này (xem Caruthers MH và cộng sự, (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser (Chuỗi hội nghị chuyên đề nghiên cứu axit nucleic)* 215-23 và Horn T và cộng sự, (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser (Chuỗi hội nghị chuyên đề nghiên cứu axit nucleic)* 225-232).

Điều chế trình tự nucleotit

Trình tự nucleotit mã hóa protein có tính chất đặc hiệu như đã xác định trong bản mô tả này hoặc protein phù hợp để cải biến có thể được nhận dạng và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế từ bất kỳ tế bào hoặc sinh vật nào sản sinh ra protein này. Người ta đã biết là có nhiều phương pháp khác nhau trong lĩnh vực cho phép nhận dạng và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế trình tự nucleotit. Ví dụ, có thể sử dụng kỹ thuật khuếch đại PCR để điều chế nhiều trình tự khi trình tự phù hợp đã được nhận dạng và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế.

Ví dụ tiếp theo, ADN của bộ gen và/hoặc thư viện ADN bổ sung có thể được cấu tạo bằng ADN nhiễm sắc thể hoặc ARN thông tin từ sinh vật sản sinh enzym. Nếu đã biết trình tự axit amin của enzym, đoạn dò oligonucleotit được gắn nhãn có thể được tổng hợp và sử dụng để nhận dạng các dòng tế bào mã hóa enzym từ thư viện bộ gen được điều chế từ sinh vật. Ngoài ra, có thể sử dụng đoạn dò oligonucleotit được gắn nhãn chứa các trình tự tương đồng với gen enzym đã biết khác để nhận dạng các dòng tế bào mã hóa enzym. Trong trường hợp sau, sử dụng sự lai hóa và điều kiện rửa ít nghiêm ngặt hơn.

Ngoài ra, các dòng tế bào mã hóa enzym có thể được nhận dạng bằng cách đưa các phân đoạn ADN của bộ gen vào vector biểu hiện, như plasmid, biến đổi vi khuẩn mang enzym âm với thư viện ADN của bộ gen thu được, và sau đó đưa vi khuẩn biến nạp lên đĩa thạch chứa cơ chất cho enzym (tức là arabinosyl), từ đó cho phép nhận dạng được các dòng tế bào biểu hiện enzym.

Hoặc, trình tự nucleotit mã hóa enzym có thể được điều chế tổng hợp bằng phương pháp tiêu chuẩn được thiết lập, ví dụ phương pháp phosphoramidite được mô tả bởi Beaucage S.L. và cộng sự, (1981) *Tetrahedron Letters* **22**, trang 1859-1869, hoặc phương

pháp được mô tả bởi Matthes và cộng sự, (1984) *EMBO J.* **3**, trang 801-805). Trong phương pháp phosphoramidite, oligonucleotit được tổng hợp, ví dụ trong máy tổng hợp ADN tự động, được tinh chế, ủ, được thắt buộc và tách dòng trong vectơ phù hợp.

Trình tự nucleotit có thể có nguồn gốc từ gốc tổng hợp và bộ gen pha trộn, gốc ADN bổ sung và tổng hợp pha trộn, gốc ADN bổ sung và bộ gen pha trộn, được điều chế bằng cách thắt buộc các phân đoạn gốc tổng hợp, bộ gen hoặc ADN bổ sung (nếu phù hợp) theo kỹ thuật tiêu chuẩn. Mỗi phân đoạn được thắt buộc tương ứng với các phần khác nhau của toàn bộ trình tự nucleotit. Trình tự ADN cũng có thể được điều chế bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) sử dụng đoạn mồi đặc hiệu, ví dụ theo mô tả trong 4,683,202 Mỹ hoặc trong Saiki R K và cộng sự, (*Science (Khoa học)* (1988) **239**, trang 487-491).

Trình tự axit amin

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm trình tự axit amin của enzym có tính chất đặc hiệu như được mô tả trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “polypeptit” và/hoặc thuật ngữ “protein”. Trong một số trường hợp, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “peptit”. Trong một số trường hợp, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “enzym”.

Trình tự axit amin có thể được điều chế/phân lập từ nguồn phù hợp, hoặc có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Tốt nhất là trình tự axit amin khi liên quan đến và khi thuộc chính phạm vi của sáng chế thì không phải là enzym tự nhiên. Về vấn đề này, thuật ngữ "enzym tự nhiên" nghĩa là toàn bộ enzym trong môi trường tự nhiên của nó và khi nó được biểu hiện bởi trình tự nucleotit tự nhiên của nó.

Đồng nhất trình tự hoặc tương đồng trình tự

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng trình tự có mức độ đồng nhất trình tự hoặc tương đồng trình tự với trình tự axit amin của polypeptit có tính chất đặc hiệu được xác định trong bản mô tả này hoặc của bất kỳ trình tự nucleotit nào mã hóa polypeptit này (sau đây gọi là "trình tự tương đồng"). Ở đây, thuật ngữ "chất đồng đẳng" nghĩa là thực thể có sự tương đồng nhất định với trình tự axit amin chủ đề và trình tự nucleotit chủ đề. Ở đây, thuật ngữ "tương đồng" có thể được xem là "đồng nhất".

Trình tự axit amin tương đồng và/hoặc trình tự nucleotit phải cung cấp và/hoặc mã hóa polypeptit, polypeptit này giữ lại hoạt tính chức năng và/hoặc nâng cao hoạt tính của enzym.

Trong ngữ cảnh hiện tại, trong một số phương án, trình tự tương đồng được hiểu là bao gồm trình tự nucleotit hoặc axit amin có thể có ít nhất 97,7% đồng nhất, tốt nhất là ít nhất 98 hoặc 99% đồng nhất với trình tự chủ đề.

Trong một số phương án, trình tự tương đồng được hiểu là bao gồm trình tự nucleotit hoặc axit amin có thể có ít nhất 85% đồng nhất, tốt nhất là ít nhất 90 hoặc 95% đồng nhất với trình tự chủ đề.

Thông thường, chất đồng đẳng sẽ bao gồm các vị trí hoạt hóa như nhau v.v., ví dụ như trình tự axit amin chủ đề. Mặc dù tính tương đồng cũng có thể được xem xét theo khía cạnh đồng dạng (tức là gốc axit amin có chức năng/tính chất hóa học giống nhau), nhưng trong ngữ cảnh của sáng chế, ưu tiên biểu hiện tính tương đồng theo khía cạnh đồng nhất trình tự.

Theo một phương án, trình tự tương đồng được hiểu là bao gồm trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có một hoặc một số bổ sung, làm mất và/hoặc thay thế so với trình tự chủ đề.

Trong ngữ cảnh hiện tại, "trình tự chủ đề" chỉ trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit/axit amin theo sáng chế.

Tốt nhất là % đồng nhất trình tự liên quan đến trình tự chuỗi polypeptit được xác định bằng cách sử dụng Số ID TRÌNH TỰ 1 làm trình tự chủ đề trong bắt cặp trình tự. Theo một phương án, trình tự chủ đề polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm Số ID TRÌNH TỰ 1, Số ID TRÌNH TỰ 26, Số ID TRÌNH TỰ 27, Số ID TRÌNH TỰ 3, Số ID TRÌNH TỰ 28, Số ID TRÌNH TỰ 29 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 5.

Tốt nhất là % đồng nhất trình tự liên quan đến trình tự nucleotit được xác định bằng cách sử dụng Số ID TRÌNH TỰ 2 làm trình tự chủ đề trong bắt cặp trình tự. Theo một phương án, trình tự chủ đề cho trình tự nucleotit có thể được chọn từ nhóm bao gồm Số ID TRÌNH TỰ 2, Số ID TRÌNH TỰ 24, Số ID TRÌNH TỰ 25, Số ID TRÌNH TỰ 4, Số ID TRÌNH TỰ 30, Số ID TRÌNH TỰ 31, Số ID TRÌNH TỰ 6, Số ID TRÌNH TỰ 32 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 33.

"Axit nucleic mẹ" hoặc "axit amin mẹ" lần lượt chỉ trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin mã hóa polypeptit mẹ.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein có trình tự axit amin được đề cập trong bản mô tả này hoặc protein được dẫn xuất từ protein (mẹ) này bằng cách thay thế, làm mất hoặc bổ sung một hoặc một số axit amin, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 axit amin, hoặc nhiều axit amin, như 10 hoặc hơn 10 axit amin trong trình tự axit amin của protein mẹ và có hoạt tính của protein mẹ.

Theo cách thức phù hợp, mức độ đồng nhất với trình tự axit amin được xác định trên ít nhất 20 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 30 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 40 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 50 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 60 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 100 axit amin liên kề, tốt nhất là trên ít nhất 200 axit amin liên kề.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic (hoặc gen) mã hóa protein có trình tự axit amin được đề cập trong bản mô tả này hoặc mã hóa protein được dẫn xuất từ protein (mẹ) bằng cách thay thế, làm mất hoặc bổ sung một hoặc một số axit amin, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 axit amin, hoặc nhiều axit amin, như 10 hoặc hơn 10 axit amin trong trình tự axit amin của protein mẹ và có hoạt tính của protein mẹ.

Trong ngữ cảnh này, theo một phương án, trình tự tương đồng hoặc trình tự ngoại lai được hiểu là bao gồm trình tự nucleotit có thể có ít nhất 97,7% đồng nhất, tốt nhất là có ít nhất 98 hoặc 99% đồng nhất với trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế (trình tự chủ đề).

Theo một phương án khác, trình tự tương đồng được hiểu là bao gồm trình tự nucleotit có thể có ít nhất 85% đồng nhất, tốt nhất là ít nhất 90 hoặc 95% đồng nhất với trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế (trình tự chủ đề).

Thông thường, chất đồng đẳng sẽ bao gồm các trình tự như nhau mã hóa cho vị trí hoạt hóa v.v. như trình tự chủ đề. Mặc dù tính tương đồng cũng có thể được xem xét theo khía cạnh đồng dạng (tức là gốc axit amin có chức năng/tính chất hóa học giống nhau), nhưng trong ngữ cảnh của sáng chế, ưu tiên biểu hiện tính tương đồng theo khía cạnh đồng nhất trình tự.

Việc so sánh tính tương đồng có thể được thực hiện bằng mắt, hoặc thông thường hơn, với sự trợ giúp của chương trình so sánh trình tự sẵn có. Những chương trình máy tính được bán trên thị trường này có thể tính % tương đồng hoặc % đồng nhất giữa hai hoặc nhiều trình tự.

Có thể tính % tương đồng hoặc % đồng nhất trên các trình tự liên kề, tức là một trình tự được bắt cặp với trình tự khác và mỗi axit amin trong một trình tự được so

sánh trực tiếp với axit amin tương ứng trong trình tự khác, một gốc một thời điểm. Đây được gọi là bắt cặp "không có khoảng trống". Thông thường sự bắt cặp không có khoảng trống này chỉ được thực hiện trên số lượng gốc tương đối thấp.

Mặc dù đây là phương pháp đơn giản và nhất quán, nhưng không được xét tới bởi vì, ví dụ, trong một cặp trình tự đồng nhất khác, việc đưa vào hoặc làm mất sẽ làm cho các gốc axit amin tiếp theo bị đưa ra khỏi sự bắt cặp, vì vậy có khả năng dẫn đến sự suy giảm lớn về % tương đồng hoặc % đồng nhất khi thực hiện bắt cặp toàn bộ. Vì vậy, hầu hết phương pháp so sánh trình tự được kiến tạo để tạo ra sự bắt cặp tối ưu có xem xét đến việc có thể đưa vào hoặc làm mất mà không ảnh hưởng quá mức đến tổng số điểm tương đồng. Có thể thực hiện việc này bằng cách chèn "khoảng trống" trong bắt cặp trình tự để tối đa hóa tính tương đồng cục bộ.

Tuy nhiên, các phương pháp phức tạp hơn gán "điểm phạt khoảng trống" cho mỗi khoảng trống xuất hiện trong bắt cặp để, đối với cùng số lượng axit amin đồng nhất, sự bắt cặp trình tự có khoảng trống ít nhất có thể - phản ánh sự liên kết cao hơn giữa hai trình tự được so sánh - sẽ đạt được điểm cao hơn bắt cặp có nhiều khoảng trống. "Chi phí khoảng trống tuyến tính" thường được sử dụng để tính phí khá cao cho sự tồn tại của khoảng trống và điểm phạt thấp hơn đối với mỗi gốc tiếp theo trong khoảng trống. Đây là hệ thống tính điểm khoảng trống được sử dụng phổ biến nhất. Điểm phạt khoảng trống cao tất nhiên sẽ tạo ra sự bắt cặp tối ưu có ít khoảng trống hơn. Hầu hết chương trình bắt cặp đều cho phép điều chỉnh điểm phạt khoảng trống. Tuy nhiên, ưu tiên sử dụng giá trị mặc định khi sử dụng phần mềm này để so sánh trình tự.

Vì thế, việc tính % tương đồng hoặc % đồng nhất tối đa trước tiên yêu cầu tạo ra sự bắt cặp tối ưu, có xem xét đến điểm phạt khoảng trống. Chương trình máy tính phù hợp để thực hiện sự bắt cặp này là Vector NTI (Invitrogen Corp.). Ví dụ về phần mềm có thể thực hiện so sánh trình tự bao gồm, nhưng không giới hạn, gói BLAST (xem Ausubel và cộng sự 1999 Short Protocols in Molecular Biology (Quy trình ngắn trong sinh học phân tử), Lần xuất bản thứ tư - Chương 18), BLAST 2 (xem FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 và tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul và cộng sự 1990 J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 403-410) và AlignX, ví dụ. Ít nhất có sẵn BLAST, BLAST 2 and FASTA cho tìm kiếm ngoại tuyến và trực tuyến (xem Ausubel và cộng sự 1999, trang 7-58 đến 7-60), ví dụ như công cụ tìm kiếm GenomeQuest (www.genomequest.com).

Mặc dù % tương đồng hoặc % đồng nhất cuối cùng có thể được đo theo tính đồng nhất, quy trình bắt cặp tự nó thường không dựa vào so sánh cặp tương đồng hoàn toàn hoặc không tương đồng. Thay vào đó, ma trận điểm tương đồng theo tỷ lệ thường được sử dụng để gán điểm số cho mỗi so sánh từng đôi dựa trên tính tương đồng hóa học hoặc khoảng cách tiến hóa. Ví dụ về ma trận thường được sử dụng này là ma trận BLOSUM62 - ma trận mặc định cho bộ chương trình BLAST. Chương trình Vector NTI thường sử dụng giá trị mặc định chung hoặc bảng so sánh biểu tượng tùy chỉnh nếu được cung cấp (xem hướng dẫn người dùng để biết thêm chi tiết). Đối với một số ứng dụng, ưu tiên sử dụng giá trị mặc định cho gói Vector NTI.

Ngoài ra, có thể tính phần trăm tương đồng bằng cách sử dụng đặc điểm bắt cặp nhiều trình tự trong Vector NTI (Invitrogen Corp.), dựa trên thuật toán, tương tự với CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Một khi phần mềm đã tạo ra sự bắt cặp tối ưu, có thể tính % tương đồng, tốt nhất là % đồng nhất trình tự. Phần mềm thường làm việc này như một phần của việc so sánh trình tự và tạo kết quả là giá trị số.

Điểm phạt khoảng trống phải được sử dụng khi xác định tính đồng nhất trình tự, sau đó tốt nhất là sử dụng các thông số sau cho bắt cặp từng đôi:

DÀNH CHO BLAST	
MỞ KHOẢNG TRỐNG	9
MỞ RỘNG KHOẢNG TRỐNG	2

DÀNH CHO CLUSTAL	ADN	PROTEIN
Ma trận trọng số	IUB	Gonnet 250
MỞ KHOẢNG TRỐNG	15	10
MỞ RỘNG KHOẢNG TRỐNG	6,66	0,1

Theo một phương án, có thể sử dụng CLUSTAL với điểm phạt khoảng trống và mở rộng khoảng trống được thiết lập như đã xác định ở trên.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit hoặc trình tự protein được xác định trên ít nhất 20 nucleotit/axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 30 nucleotit/axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 40 nucleotit/axit amin liền kề, tốt

nhất là trên ít nhất 50 nucleotit/axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 60 nucleotit/axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 100 nucleotit/axit amin liền kề.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit được xác định trên ít nhất 100 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 200 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 300 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 400 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 500 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 600 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 700 nucleotit liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 800 nucleotit liền kề.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này như trình tự trưởng thành, ví dụ Số ID TRÌNH TỰ 2 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 24 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 25 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 4, Số ID TRÌNH TỰ 30, Số ID TRÌNH TỰ 31, Số ID TRÌNH TỰ 6, Số ID TRÌNH TỰ 32 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 33. Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này như Số ID TRÌNH TỰ 2.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự protein (axit amin) được xác định trên ít nhất 100 axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 200 axit amin liền kề, tốt nhất là trên ít nhất 300 axit amin liền kề.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự axit amin hoặc protein có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này.

Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự axit amin hoặc protein có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này như trình tự trưởng thành, ví dụ Số ID TRÌNH TỰ 1, Số ID TRÌNH TỰ 26, Số ID TRÌNH TỰ 27, Số ID TRÌNH TỰ 3, Số ID TRÌNH TỰ 28, Số ID TRÌNH TỰ 29 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 5. Tốt nhất là, mức độ đồng nhất đối với trình tự axit amin hoặc protein có thể được xác định trên toàn bộ trình tự được đề cập trong bản mô tả này như Số ID TRÌNH TỰ 1.

Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "trình tự truy vấn" nghĩa là trình tự tương đồng hoặc trình tự ngoại lai được bắt cặp với trình tự chủ đề để xem nó có thuộc phạm vi của sáng chế hay không. Theo đó, trình tự truy vấn có thể, ví dụ, là trình tự trong kỹ thuật trước đây hoặc trình tự bên thứ ba.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự được bắt cặp bởi chương trình bắt cặp toàn bộ và đồng nhất trình tự được tính bằng cách xác định số trùng khớp chính xác được xác định bằng chương trình được chia cho chiều dài của trình tự chủ đề.

Theo một phương án, mức độ đồng nhất trình tự giữa trình tự truy vấn và trình tự chủ đề được xác định bằng cách 1) bắt cặp hai trình tự bằng chương trình bắt cặp phù hợp bất kỳ sử dụng ma trận tính điểm mặc định và điểm phạt khoảng trống mặc định, 2) xác định số trùng khớp chính xác, trong đó trùng khớp chính xác là khi chương trình bắt cặp đã nhận dạng axit amin hoặc nucleotit đồng nhất trong hai trình tự được bắt cặp ở vị trí đã cho khi bắt cặp và 3) chia số trùng khớp chính xác với chiều dài của trình tự chủ đề.

Theo phương án ưu tiên khác, chương trình bắt cặp toàn bộ được chọn từ nhóm bao gồm CLUSTAL và BLAST (tốt nhất là BLAST) và đồng nhất trình tự được tính bằng cách nhận dạng số trùng khớp chính xác được xác định bằng chương trình được chia cho chiều dài của trình tự chủ đề.

Các trình tự cũng có thể có sự làm mất, chèn hoặc thay thế gốc axit amin tạo chất tương đương về chức năng. Việc thay thế axit amin có chủ ý có thể được thực hiện trên cơ sở tương đồng về sự phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, axit amin tích điện âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic; axit amin tích điện dương bao gồm lysin và arginin; và axit amin với nhóm đầu cực không tích điện có giá trị ưa nước tương tự bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, glyxin, alanin, asparagin, glutamin, serin, threonin, phenylalanin, và tyrosin.

Có thể thực hiện thay thế bảo thủ, ví dụ theo Bảng bên dưới. Axit amin trong cùng ô ở cột thứ hai và tốt nhất trong cùng hàng ở cột thứ ba có thể được thay thế cho nhau:

BÉO	Không phân cực	G A P
		I L V
	Phân cực – không tích điện	C S T M
		N Q
	Phân cực – tích điện	D E
		K R
THƠM		H F W Y

Sáng chế cũng bao gồm sự thay thế tương đồng (thay thế và thế chỗ đều được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ sự thay thế gốc axit amin hiện tại bằng một gốc khác) có thể xảy ra, tức là sự thay thế tương ứng như bazơ thay cho bazơ, axit thay cho axit, phân cực thay cho phân cực, v.v. Thay thế không tương đồng cũng có thể xảy ra, tức là từ một lớp của gốc đến lớp khác hoặc liên quan đến việc bao gồm axit amin không tự nhiên như ornithin (sau đây được gọi là Z), ornithin axit diaminobutyric (sau đây được gọi là B), norleucine ornithine (sau đây được gọi là O), pyriylalanine, thienylalanine, naphthylalanine và phenylglyxin.

Sự thay thế cũng có thể được thực hiện bởi axit amin không tự nhiên bao gồm; axit amin α * và axit amin hai lần thế α *, axit amin N-alkyl*, axit lactic*, dẫn xuất halogen của axit amin tự nhiên như triflortyrosin*, p-Cl-phenylalanin*, p-Br-phenylalanin*, p-I-phenylalanin*, L-allyl-glyxin*, β -alanin*, axit L- α -amino butyric*, axit L- γ -amino butyric*, axit L- α -amino isobutyric*, axit L- ϵ -amino caproic[#], axit 7-amino heptanoic*, L-metionin sulfon^{##}, L-norleucine*, L-norvaline*, p-nitro-L-phenylalanin*, L-hydroxyproline[#], L-thiopropine*, dẫn xuất metyl của phenylalanin (Phe) như 4-metyl-Phe*, pentametyl-Phe*, L-Phe (4-amino)[#], L-Tyr (metyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (axit 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxyl)*, axit L-diaminopropionic[#] và L-Phe (4-benzyl)*. Ký hiệu * được sử dụng vì mục đích của phần trình bày bên trên (liên quan đến việc thay thế tương đồng hoặc không tương đồng), để biểu thị tính kỵ nước của chất dẫn xuất, trong khi đó # được sử dụng để biểu thị tính ưa nước của chất dẫn xuất, ## biểu thị đặc điểm lưỡng tính.

Các trình tự axit amin biến thể có thể bao gồm các nhóm đoạn đệm phù hợp có thể được chèn vào giữa hai gốc axit amin bất kỳ của trình tự bao gồm nhóm alkyl như metyl, etyl hoặc nhóm propyl ngoài các đoạn đệm axit amin như gốc glyxin hoặc β -alanin. Dạng biến thể khác, liên quan đến sự có mặt của một hoặc nhiều gốc axit amin ở dạng peptoid, sẽ được các chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rõ. Để tránh nhầm lẫn, "dạng peptoid" được sử dụng để chỉ các gốc axit amin biến thể, trong đó nhóm thế α -carbon nằm trên nguyên tử nitơ của gốc chứ không phải α -carbon. Quy trình điều chế peptit dưới dạng peptoid được biết đến trong lĩnh vực, ví dụ Simon RJ và cộng sự, *PNAS* (1992) **89**(20), 9367-9371 và Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (Các xu hướng trong công nghệ sinh học) (1995) **13**(4), 132-134.

Theo một phương án, xylanaza được sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm trình tự chuỗi polypeptit được trình bày có Số ID TRÌNH TỰ 17, Số ID TRÌNH TỰ 18, Số ID TRÌNH TỰ 19, Số ID TRÌNH TỰ 20, hoặc Số ID TRÌNH TỰ 21 với sự thay thế bảo thủ ít nhất một trong các axit amin.

Tốt nhất là, có ít nhất 2 thay thế bảo thủ, như ít nhất 3 hoặc ít nhất 4 hoặc ít nhất 5.

Tốt nhất là, có ít hơn 15 thay thế bảo thủ, như ít hơn 12, ít hơn 10, ít hơn 8 hoặc ít hơn 5 thay thế bảo thủ.

Trình tự nucleotit được sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm nucleotit cải biến hoặc tổng hợp. Số kiểu cải biến khác nhau đối với oligonucleotit đã được biết đến trong ngành. Các kiểu này bao gồm khung methylphosphonate và phosphorothioate và/hoặc bổ sung chuỗi acridin hoặc polylysine ở đầu 3' và/hoặc 5' của phân tử. Vì mục đích của sáng chế, có thể hiểu rằng các trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này có thể được làm cải biến bằng bất kỳ phương pháp nào hiện có trong ngành. Có thể thực hiện cải biến như vậy để nâng cao hoạt tính *trong cơ thể sống* hoặc tuổi thọ của trình tự nucleotit của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự được đề cập trong bản mô tả này, hoặc chất dẫn xuất, phân đoạn hoặc chất dẫn xuất bất kỳ của chúng. Nếu trình tự bổ sung cho phân đoạn của nó thì có thể sử dụng trình tự đó làm đoạn dò để nhận dạng trình tự mã hóa tương tự trong sinh vật tự nhiên khác v.v.

Polynucleotit không tương đồng 100% với trình tự của sáng chế nhưng thuộc phạm vi của sáng chế có thể thu được theo nhiều cách. Có thể thu được các biến thể khác của trình tự được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, bằng cách thăm dò thư viện ADN được tạo ra từ các cá thể riêng lẻ, ví dụ cá thể riêng lẻ từ các quần thể khác nhau. Ngoài ra, có thể thu được chất đồng đẳng khác và chất đồng đẳng này và phân đoạn của nó nói chung sẽ có khả năng lai hóa chọn lọc thành các trình tự được trình bày trong danh sách trình tự trong bản mô tả này. Có thể thu được các trình tự này bằng cách thăm dò thư viện ADN bổ sung được tạo ra từ hoặc thư viện ADN của bộ gen từ các loài động vật khác, và thăm dò thư viện này bằng đoạn dò bao gồm toàn bộ hoặc một phần của một trình tự bất kỳ trong danh sách trình tự đính kèm trong điều kiện nghiêm ngặt ở mức độ từ trung bình đến cao. Áp dụng các xem xét tương tự cho chất đồng đẳng ở các loài thu được và biến thể allen của trình tự polynucleotit hoặc nucleotit của sáng chế.

Các biến thể và chất đồng đẳng ở dòng/loài cũng có thể thu được bằng cách sử dụng PCR suy biến, PCR này sẽ sử dụng đoạn mồi được kiến tạo để nhắm đến các trình tự trong phạm vi các biến thể và chất đồng đẳng mã hóa trình tự axit amin bảo thủ trong phạm vi các trình tự của sáng chế. Có thể dự đoán các trình tự bảo thủ, ví dụ, bằng cách bắt cặp trình tự axit amin từ một số biến thể/chất đồng đẳng. Có thể thực hiện bắt cặp trình tự bằng các sử dụng phần mềm máy tính được biết đến trong ngành. Ví dụ chương trình GCG Wisconsin PileUp được sử dụng rộng rãi.

Đoạn mồi được sử dụng trong PCR suy biến sẽ chứa một hoặc nhiều vị trí suy biến và sẽ được sử dụng ở điều kiện ít nghiêm ngặt hơn đoạn mồi được sử dụng để tách dòng các trình tự với đoạn mồi trình tự đơn đối với trình tự đã biết.

Ngoài ra, có thể thu được các polynucleotit này bằng cách gây đột biến được định hướng vị trí ở các trình tự đặc trưng. Việc này có thể hữu ích khi, ví dụ, cần thay đổi trình tự codon cam để tối ưu hóa ưu tiên codon cho tế bào chủ cụ thể mà trong đó trình tự polynucleotit đang được biểu hiện. Các thay đổi trình tự khác có thể cần thiết để đưa vị trí nhận dạng enzym giới hạn vào, hoặc để thay đổi tính chất hoặc chức năng của polypeptit được mã hóa bằng polynucleotit.

Polynucleotit (trình tự nucleotit) của sáng chế có thể được sử dụng để tạo đoạn mồi, ví dụ đoạn mồi PCR, đoạn mồi dành cho phản ứng khuếch đại thay thế, ví dụ đoạn dò được gắn nhãn bằng nhãn biểu lộ bằng phương tiện thông thường sử dụng nhãn phóng xạ hoặc không phóng xạ, hoặc polynucleotit có thể được tách dòng thành vector. Đoạn mồi, đoạn dò này và các phân đoạn khác sẽ có chiều dài ít nhất là 15, tốt nhất ít nhất là 20, ví dụ ít nhất 25, 30 hoặc 40 nucleotit, và cũng bao gồm trong thuật ngữ polynucleotit của sáng chế được sử dụng trong bản mô tả này.

Các polynucleotit như đoạn dò và polynucleotit ADN theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, tổng hợp, hoặc bằng bất kỳ phương tiện nào có sẵn đối với các chuyên gia trong ngành. Chúng cũng có thể được tách dòng bằng kỹ thuật tiêu chuẩn.

Nói chung, đoạn mồi sẽ được tạo bằng cách tổng hợp, bao gồm việc sản xuất từng bước một nucleotit của trình tự axit nucleic mong muốn trong một thời điểm. Thực hiện việc này bằng cách sử dụng kỹ thuật tự động đã có sẵn trong ngành.

Polynucleotit dài hơn thường sẽ được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, ví dụ sử dụng kỹ thuật tách dòng PCR (phản ứng chuỗi polymeraza). Đoạn mồi có thể được kiến tạo để chứa vị trí nhận dạng enzym giới hạn phù hợp để ADN được khuếch đại có thể được tách dòng thành vector tách dòng phù hợp.

Đánh số axit amin

Trong sáng chế này, có thể sử dụng việc đánh số cụ thể vị trí gốc axit amin trong xylanaza được sử dụng trong sáng chế. Bằng cách bắt cặp trình tự axit amin của xylanaza mẫu với xylanaza của sáng chế (cụ thể là Số ID TRÌNH TỰ 1), có thể chỉ định số cho vị trí gốc axit amin trong xylanaza mẫu này tương ứng với vị trí gốc axit amin hoặc đánh số trình tự axit amin được thể hiện trong Số ID TRÌNH TỰ của sáng chế.

Sự lai hóa

Sáng chế này cũng bao gồm trình tự bổ sung cho trình tự axit nucleic của sáng chế hoặc trình tự có khả năng lai hóa thành trình tự của sáng chế hoặc trình tự bổ sung cho trình tự của sáng chế.

Thuật ngữ "lai hóa" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm "quy trình mà sợi axit nucleic liên kết với sợi bổ sung thông qua việc bắt cặp bazơ" cũng như quy trình khuếch đại như đã được thực hiện theo kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng trình tự nucleotit có khả năng lai hóa thành trình tự bổ sung cho trình tự được đề cập trong bản mô tả này, hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng.

Thuật ngữ "biến thể" cũng bao gồm các trình tự bổ sung cho các trình tự có khả năng lai hóa thành trình tự nucleotit được đề cập trong bản mô tả này.

Tốt nhất là thuật ngữ "biến thể" bao gồm các trình tự bổ sung cho các trình tự có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt (ví dụ 50°C và 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na₃xitrat 0,015 M, pH 7,0}) thành trình tự nucleotit được đề cập trong bản mô tả này.

Tốt hơn nữa là thuật ngữ "biến thể" bao gồm các trình tự bổ sung cho các trình tự có khả năng lai hóa dưới điều kiện rất nghiêm ngặt (ví dụ 65°C và 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na₃xitrat 0,015 M, pH 7,0}) thành trình tự nucleotit được đề cập trong bản mô tả này.

Sáng chế này cũng đề cập đến các trình tự nucleotit có thể lai hóa thành các trình tự nucleotit của sáng chế (bao gồm các trình tự bổ sung của các trình tự được đề cập trong bản mô tả này).

Sáng chế này cũng đề cập đến các trình tự nucleotit bổ sung cho các trình tự có thể lai hóa thành các trình tự nucleotit của sáng chế (bao gồm các trình tự bổ sung của các trình tự được đề cập trong bản mô tả này).

Tốt nhất là sự lai hóa được phân tích trên toàn bộ các trình tự được đề cập trong bản mô tả này.

Biểu hiện enzym

Trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế có thể được hợp nhất vào vector có thể sao chép tái tổ hợp. Có thể sử dụng vector để sao chép và biểu hiện trình tự nucleotit, ở dạng protein/enzym, trong và/hoặc từ tế bào chủ tương thích.

Có thể kiểm soát biểu hiện bằng cách sử dụng các trình tự đối chứng, ví dụ các trình tự điều hòa.

Protein được tạo ra bằng tế bào chủ tái tổ hợp bằng biểu hiện của trình tự nucleotit có thể được tiết ra hoặc được chứa trong tế bào tùy trình tự và/hoặc vector được sử dụng. Trình tự mã hóa có thể được kiến tạo với trình tự tín hiệu định hướng sự tiết ra chất mã hóa trình tự thông qua màng tế bào nhân sơ hoặc nhân thực.

Vector biểu hiện

Thuật ngữ "vector biểu hiện" nghĩa là cấu trúc có khả năng biểu hiện *trong cơ thể sống* hoặc *trong ống nghiệm*.

Tốt nhất là vector biểu hiện được hợp nhất vào bộ gen của sinh vật chủ phù hợp. Thuật ngữ "hợp nhất" tốt nhất là bao gồm sự hợp nhất ổn định vào bộ gen.

Trình tự nucleotit của sáng chế có thể có mặt trong vector trong đó trình tự nucleotit có thể liên kết với các trình tự điều hòa có khả năng cung cấp biểu hiện của trình tự nucleotit thông qua sinh vật chủ phù hợp.

Vector được sử dụng trong sáng chế có thể được biến nạp thành tế bào chủ phù hợp như được mô tả ở phần bên dưới để cung cấp biểu hiện của polypeptit của sáng chế.

Việc lựa chọn vector, ví dụ plasmid, cosmid, hoặc vector thực khuẩn thường sẽ tùy thuộc vào tế bào chủ mà nó được đưa vào.

Vector được sử dụng trong sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều gen đánh dấu lựa chọn- như gen, tạo nên sự đề kháng kháng sinh, ví dụ kháng ampicilin, kanamycin, chloramphenicol hoặc tetracyclin. Ngoài ra, có thể lựa chọn bằng cách đồng biến nạp (như được mô tả trong WO91/17243).

Có thể sử dụng vector *trong ống nghiệm*, ví dụ để tạo ra ARN hoặc được sử dụng để chuyển nạp, biến nạp, chuyển đổi hoặc truyền tế bào chủ.

Vì vậy, theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra trình tự nucleotit của sáng chế bằng cách đưa trình tự nucleotit của sáng chế vào trong vector có thể sao chép, đưa vector vào trong tế bào chủ tương thích và phát triển tế bào chủ trong các điều kiện giúp sao chép vector.

Vectơ có thể còn bao gồm trình tự nucleotit giúp vectơ sao chép trong tế bào chủ đang đề cập. Ví dụ về các trình tự này là các gốc sao chép của plasmit pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 và pIJ702.

Trình tự điều hòa

Trong một số ứng dụng, trình tự nucleotit được sử dụng trong sáng chế có thể liên kết với trình tự điều hòa có khả năng cung cấp biểu hiện của trình tự nucleotit, như bằng cách thông qua tế bào chủ đã chọn. Ví dụ, sáng chế bao gồm vectơ chứa trình tự nucleotit của sáng chế có thể liên kết với trình tự điều hòa này, tức là vectơ là vectơ biểu hiện.

Thuật ngữ "có thể liên kết" chỉ sự liên kết nhau, trong đó các thành phần được mô tả trong mối quan hệ cho phép chúng hoạt động theo cách thức định sẵn. Trình tự điều hòa "có thể liên kết" với trình tự mã hóa được thắt buộc sao cho đạt được biểu hiện của trình tự mã hóa trong điều kiện tương thích với trình tự đối chứng.

Thuật ngữ "trình tự điều hòa" bao gồm vùng khởi động và vùng tăng cường và các tín hiệu điều hòa biểu hiện khác.

Thuật ngữ "vùng khởi động" được sử dụng theo nghĩa thông thường trong ngành, ví dụ vị trí liên kết polymeraza ARN.

Biểu hiện tăng cường của trình tự nucleotit mã hóa enzym của sáng chế cũng có thể đạt được bằng cách lựa chọn các vùng điều hòa không tương đồng, ví dụ vùng khởi động, vùng dẫn đầu sự tiết và vùng kết thúc.

Tốt nhất là trình tự nucleotit theo sáng chế có thể liên kết với ít nhất là vùng khởi động.

Các vùng khởi động khác có thể được dùng để định hướng biểu hiện của polypeptit của sáng chế.

Các ví dụ về vùng khởi động phù hợp để định hướng phiên mã của trình tự nucleotit trong vật chủ vi khuẩn, nấm hoặc nấm men đã được biết đến trong ngành.

Vùng khởi động có thể bao gồm thêm các đặc điểm để đảm bảo hoặc tăng cường biểu hiện trong vật chủ phù hợp. Ví dụ, các đặc điểm có thể là các vùng bảo thủ như Hộp Pribnow hoặc hộp TATA.

Cấu trúc

Thuật ngữ "cấu trúc" - đồng nghĩa với thuật ngữ như "liên hợp", "cassette" và "lai chủng" - bao gồm trình tự nucleotit được sử dụng theo sáng chế gắn liền với vùng khởi động một cách trực tiếp hoặc gián tiếp.

Ví dụ về sự gắn liền gián tiếp là sự cung cấp nhóm đoạn đệm phù hợp như trình tự intron, như intron Sh1 hoặc intron ADH, trung gian giữa vùng khởi động và trình tự nucleotit của sáng chế. Tương tự như vậy đối với thuật ngữ "hợp nhất" trong sáng chế bao gồm sự gắn liền trực tiếp hoặc gián tiếp. Trong một số trường hợp, thuật ngữ không bao gồm sự kết hợp tự nhiên của trình tự nucleotit mã hóa cho protein liên kết thông thường với vùng khởi động gen kiểu đại và khi chúng đều ở trong môi trường tự nhiên của chúng.

Thậm chí cấu trúc có thể chứa hoặc biểu hiện gen đánh dấu, cho phép lựa chọn cấu trúc di truyền.

Đối với một số ứng dụng, tốt nhất là cấu trúc của sáng chế bao gồm ít nhất trình tự nucleotit của sáng chế có thể liên kết với vùng khởi động.

Tế bào chủ

Thuật ngữ "tế bào chủ" - liên quan đến sáng chế bao gồm tế bào bất kỳ bao gồm trình tự nucleotit hoặc vector biểu hiện như được mô tả ở phần trên và được sử dụng trong sản xuất protein tái tổ hợp có tính chất đặc hiệu như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sinh vật là vật chủ biểu hiện.

Vì vậy, phương án khác của sáng chế cung cấp tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nạp với trình tự nucleotit biểu hiện protein của sáng chế. Tế bào sẽ được chọn sẽ tương thích với vector đã nêu và có thể là, ví dụ, tế bào nhân sơ (ví dụ vi khuẩn), nấm hoặc nấm men.

Ví dụ về sinh vật chủ vi khuẩn phù hợp là loài vi khuẩn gam dương hoặc gam âm.

Theo một phương án, xylanaza được đề cập trong bản mô tả này được biểu hiện trong vật chủ biểu hiện *Trichoderma reesei*.

Trong một số phương án, vật chủ biểu hiện cho xylanaza được đề cập trong bản mô tả này có thể là một hoặc nhiều vật chủ biểu hiện là nấm sau đây: *Fusarium* spp. (như *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (như *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, hoặc *A. awamori*) hoặc *Trichoderma* spp. (như *T. reesei*).

Trong một số phương án, vật chủ biểu hiện có thể là một hoặc nhiều trong số các vật chủ biểu hiện là vi khuẩn sau đây: *Streptomyces* spp. hoặc *Bacillus* spp. (ví dụ *Bacillus subtilis* hoặc *B. licheniformis*).

Việc sử dụng tế bào chủ phù hợp - như tế bào chủ là nấm men và nấm - có thể cung cấp sự điều hòa sau dịch mã (ví dụ myristoyl hóa, glycosyl hóa, sự cắt đứt, lipid

hóa và tyrosin, serin hoặc phosphoryl hóa threonin) khi cần để mang đến hoạt tính sinh học tối ưu trên sản phẩm biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế.

Sinh vật

Thuật ngữ "sinh vật" trong sáng chế bao gồm bất kỳ sinh vật nào có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế và/hoặc sản phẩm thu được từ đó, và/hoặc trong đó vùng khởi động có thể cho phép biểu hiện của trình tự nucleotit theo sáng chế khi có mặt trong sinh vật.

Theo một phương án, sinh vật là vật chủ biểu hiện.

Sinh vật phù hợp có thể bao gồm sinh vật nhân sơ, nấm, nấm men hoặc thực vật.

Thuật ngữ "sinh vật biến đổi gen" trong sáng chế bao gồm bất kỳ sinh vật nào bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế và/hoặc sản phẩm thu được từ đó, và/hoặc trong đó vùng khởi động có thể cho phép biểu hiện của trình tự nucleotit theo sáng chế khi ở trong sinh vật. Tốt nhất là trình tự nucleotit được hợp nhất vào bộ gen của sinh vật.

Thuật ngữ "sinh vật biến đổi gen" không bao gồm trình tự mã hóa nucleotit tự nhiên trong môi trường tự nhiên của chúng khi chúng chịu sự kiểm soát của vùng khởi động tự nhiên của chúng cũng nằm trong môi trường tự nhiên.

Vì vậy, sinh vật biến đổi gen của sáng chế bao gồm sinh vật chứa trình tự hoặc tổ hợp trình tự bất kỳ trong các trình tự nucleotit hoặc tổ hợp trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit theo sáng chế, cấu trúc theo sáng chế, vector theo sáng chế, plasmid theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, mô theo sáng chế hoặc sản phẩm theo sáng chế.

Ví dụ, sinh vật biến đổi gen cũng có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit của sáng chế dưới sự kiểm soát của vùng khởi động không tương đồng.

Biến nạp tế bào/sinh vật chủ

Như đã nêu ở phần trước, sinh vật chủ có thể là sinh vật nhân sơ hoặc nhân thực. Ví dụ về vật chủ nhân sơ bao gồm *E. coli*, *Streptomyces* spp. và *Bacillus* spp., ví dụ *Bacillus subtilis*.

Những học thuyết về biến nạp vật chủ nhân sơ được chứng minh rõ bằng tài liệu trong ngành, ví dụ, xem Sambrook và cộng sự (Molecular Cloning (Tách dòng phân tử): A Laboratory Manual (Hướng dẫn phòng thí nghiệm, ấn bản thứ 2, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Nếu vật chủ nhân sơ được sử dụng, thì có thể cần cải biến phù hợp trình tự nucleotit trước khi biến nạp - như bằng cách loại bỏ intron.

Tế bào nấm dạng sợi có thể được biến nạp bằng các phương pháp khác nhau được biết đến trong ngành - như quy trình liên quan đến sự hình thành thể nguyên sinh và biến nạp thể nguyên sinh, sau đó là tái tạo thành tế bào theo cách thức đã biết. Việc sử dụng *Aspergillus* làm vi sinh vật chủ được mô tả trong EP 0 238 023.

Biến nạp sinh vật nhân sơ, nấm và nấm men thường được chuyên gia trong ngành biết đến.

Sinh vật chủ có thể là nấm - như nấm mốc. Ví dụ về vật thể chủ phù hợp này bao gồm thành viên bất kỳ thuộc giống *Trichoderma* (ví dụ *T. reesei*), *Thermomyces*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora* và tương tự.

Theo một phương án, sinh vật chủ có thể là nấm. Theo một phương án ưu tiên, sinh vật chủ thuộc giống *Trichoderma*, ví dụ *T. reesei*).

Nuôi cấy và sản xuất

Tế bào chủ biến nạp bằng trình tự nucleotit của sáng chế có thể được nuôi cấy trong các điều kiện có lợi cho sản xuất polypeptit được mã hóa và tạo điều kiện thu hồi polypeptit từ tế bào và/hoặc môi trường nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy tế bào có thể là môi trường thông thường phù hợp bất kỳ để nuôi cấy tế bào chủ đang đề cập và thu được biểu hiện của polypeptit.

Protein được tạo ra bởi tế bào tái tổ hợp có thể được biểu hiện lên trên bề mặt tế bào.

Protein có thể được tiết ra từ tế bào chủ và có thể được thu hồi một cách thuận lợi từ môi trường nuôi cấy bằng quy trình đã biết.

Sự tiết ra

Thông thường, người ta mong muốn protein sẽ được tiết ra từ vật chủ biểu hiện vào môi trường nuôi cấy mà từ đó protein có thể được thu hồi dễ dàng hơn. Theo sáng chế, trình tự dẫn đầu sự tiết ra có thể được lựa chọn trên cơ sở vật chủ biểu hiện mong muốn. Trình tự tín hiệu lai cũng có thể được sử dụng theo ngữ cảnh của sáng chế.

Ứng dụng trên quy mô lớn

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, trình tự axit amin được sử dụng cho các ứng dụng trên quy mô lớn.

Tốt nhất là trình tự axit amin được tạo ra theo số lượng từ 1 g trên mỗi lít đến khoảng 100 g trên mỗi lít trong tổng thể tích nuôi cấy tế bào sau khi nuôi cấy sinh vật chủ.

Tốt nhất là trình tự axit amin được tạo ra theo số lượng từ 30 g trên mỗi lít đến khoảng 90 g trên mỗi lít trong tổng thể tích nuôi cấy tế bào sau khi nuôi cấy sinh vật chủ.

Kỹ thuật, phương pháp luận về ADN tái tổ hợp tổng quát

Sáng chế sử dụng, trừ khi có chỉ định khác, kỹ thuật thông thường về hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp và miễn dịch học, tất cả nằm trong khả năng của chuyên gia bình thường trong ngành. Các kỹ thuật này đã được giải thích trong bản mô tả này. Xem, ví dụ, J. Sambrook, E. F. Fritsch, và T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning (Tách dòng phân tử): A Laboratory Manual* (Hướng dẫn phòng thí nghiệm), ấn bản thứ hai, Quyển 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. và cộng sự (1995 và bổ sung thường kỳ; *Current Protocols in Molecular Biology (Quy trình hiện nay trong sinh học phân tử)*, chương 9, 13, và 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, và A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing (Giải trình tự và phân lập ADN): Essential Techniques (Các kỹ thuật cần thiết)*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis (Tổng hợp Oligonucleotide): A Practical Approach (Phương pháp tiếp cận thực tế)*, Irl Press; và, D. M. J. Lilley và J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology (Phương pháp Enzym học): DNA Structure Part A (Cấu trúc ADN phần A): Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods (Phương pháp tổng hợp và phân tích vật lý ADN)* trong Enzym học, Academic Press. Mỗi văn bản tổng quát này được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn.

Sáng chế sau đây sẽ được mô tả ví dụ, theo các Hình và Ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp

Xây dựng thư viện và plasmit

Trình tự ADN chứa vùng mã hóa dành cho xylanaza 4 (họ GH10) từ nấm dạng sợi *Fusarium verticilloides*, FveXyn4, được khuếch đại từ ADN của bộ gen với đoạn môi đặc hiệu gen được kéo dài với vị trí attB1 và attB2 để cho phép tái tổ hợp Gateway® BP tách dòng thành vectơ pDonor221 (Invitrogen, USA). Plasmit pEntry-FveXyn4, như được minh họa trong Hình 20, được các nhà cung cấp BaseClear (Hà Lan) và Geneart GmH (Đức) sử dụng làm mẫu để xây dựng thư viện tổ hợp.

Các biến thể của FveXyn4 đã được tạo ra như các thư viện tổ hợp hoặc được tạo ra bằng cách đưa đột biến đặc hiệu vào và được kiến tạo để bao gồm số lượng và tổ hợp đột biến khác nhau được trình bày trong Bảng 1. Biến thể A, B, C, D và E và các biến thể của Ví dụ 12 đều được bao gồm trong các biến thể này.

Biến thể tổ hợp được tạo bằng kỹ thuật tái tổ hợp Gateway® (Invitrogen, USA) với vector đích pTTTpyr2 (Hình 21). Plasmid biểu hiện thu được pTTTpyr2-FveXyn4_VAR biểu hiện Xyn4 với các đột biến khác nhau được khuếch đại trong dòng *Escherichia coli* DH5a, được tinh chế, được giải trình tự, được sắp xếp riêng trong 96 MTP và được sử dụng để biến nạp nấm. Vector biểu hiện chứa vùng khởi động *T. reesei cbhI* và vùng kết thúc cho phép biểu hiện cảm ứng mạnh của gen quan tâm, gen đánh dấu chọn lọc *Aspergillus nidulans amdS* và *T. reesei pyr2* tạo sự tăng trưởng thể biến nạp trong môi trường tối thiểu với axetamid khi không có uridin. Plasmid được duy trì độc lập trong tế bào nấm do vùng điểm cuối của nhiễm sắc thể dẫn xuất từ *T. reesei*. Việc sử dụng plasmid sao chép dẫn đến tần suất biến nạp gia tăng và tránh các vấn đề về biểu hiện phụ thuộc lôcut quan sát được với sự biến nạp nấm tích hợp.

Đột biến đặc hiệu được đưa vào trình tự bộ gen của xylanaza Xyn4 ở *Fusarium verticilloides* thông qua sự tổng hợp gen *de novo* (mới) (GeneArt GmbH, Đức). Sau đó các biến thể tổng hợp được nhà cung cấp tách dòng thành vector đích pTTT-pyr2 bằng kỹ thuật tái tổ hợp Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Các dòng nấm, môi trường tăng trưởng và sự biến nạp

Plasmid biểu hiện (5-10 µl) được biến nạp bằng phương pháp thể nguyên sinh PEG thành dòng a *T. reesei* được loại bỏ đối với xenulaza chính và xylanaza 2 ($\Delta cbh1 \Delta cbh2 \Delta egl1 \Delta egl2 \Delta egl3 \Delta egl4 \Delta egl5 \Delta egl6 \Delta bgl1 \Delta man1 \Delta xyn2$ Prdiv: iRNA $xyn1$ $xyn3$: *amdS pyr2*-). Tiếp tục đạt được sự giảm biểu hiện bổ sung của nền xylanaza 1 và 3 nội sinh qua việc đưa cassette can thiệp ARN can thiệp (iRNA) vào bộ gen chủng chủ nhằm mục đích ngừng biểu hiện *xyn1* và *xyn3* cùng lúc. Tất cả biến nạp thông lượng cao được thực hiện bằng rôbot trong khuôn MTP 24 lỗ sử dụng rôbot Biomek (Beckman Coulter, Hoa Kỳ). Plasmid với các biến thể đã được nhận từ các nhà cung cấp trong MTP 96 lỗ được sắp xếp theo bố cục được xác định trước. Hỗn hợp biến nạp chứa khoảng 1 µg ADN và 5×10^6 thể nguyên sinh trong tổng thể tích 50 µl được xử lý bằng 200 µl dung dịch PEG 25%, được pha loãng với 1 thể tích sorbitol 1,2M/Tris 10 mM, pH 7,5/ dung dịch CaCl₂ 10 mM, được sắp xếp lại bằng rôbot vào trong MTP 24 lỗ và được trộn với 1 ml môi chất tối thiểu agarosa 3% chứa sorbitol 1M và NH₄Cl 10 mM. Sau khi tăng trưởng thể biến nạp, các bào tử từ mỗi lỗ được tập hợp và ráp lại trên MTP 24 lỗ mới với MM (môi chất tối thiểu) chứa axetamid cho áp suất chọn lọc bổ sung. Khi đã hình thành bào tử, các bào tử được thu hoạch và sử dụng để cấy truyền môi trường chất lỏng trong khuôn MTP 24 lỗ hoặc bình lắc trong môi chất sản xuất sau đây: 37 g/l glucoza, 1 g/l sophorose, 9 g/l axit

casmio, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33 g/l 1,4-Piperazinebis(axit propanesulfonic), pH 5,5, 2,5 ml/L nguyên tố vi lượng *T. reesei* 400X (175 g/l axit xitric, 200 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/l axit boric). 1 ml môi chất sản xuất đã được thêm vào để tạo ra biến thể trong MTP 24 lỗ. Đối với bình lắc, các thể tích đã được tăng lên.

Các đĩa đã được nuôi cấy trong 6 ngày ở 28°C và độ ẩm 80% và được lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Các lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy được thu thập bằng cách lọc chân không và được sử dụng để xét nghiệm hiệu quả cũng như mức độ biểu hiện của chúng.

Đối với việc sản xuất ở quy mô lớn hơn, thực hiện lên men trong thiết bị phản ứng khuấy trộn liên tục có thể hấp 6 lít. Bình lắc được cấy truyền bào tử và được ủ cùng và được lắc trong 3 ngày ở 28°C trong môi chất bình lắc sau: 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,5 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14,4 g/l axit xitric $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 27,5 g/l glucoza, 1 giọt chất chống bọt (EROL DF 6000K). Độ pH được điều chỉnh với NaOH (2M) đến 5,5 và môi chất được chung hấp trong 20 phút ở 122°C. Sau khi làm mát, 2,5 ml/L nguyên tố vi lượng *T. reesei* 400X (175 g/l axit xitric, 200 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/l axit boric) đã được bổ sung. Các tế bào từ bình lắc được sử dụng để cấy truyền cho nồi phản ứng sinh học chứa môi chất nồi phản ứng sinh học sau đây: 4,7 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 45 g/l glucoza, 0,7 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l chất chống bọt (EROL DF 6000K), 2,5 ml/L nguyên tố vi lượng *T. reesei* 400X (175 g/l axit xitric, 200 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/l axit boric). Nhiệt độ được kiểm soát ở 34°C; độ pH được kiểm soát liên tục bằng cách thêm amoni hydroxit 20%. Oxy hòa tan được kiểm soát đến mức bão hòa tối thiểu là 40% bằng cách thay đổi tốc độ khuấy. Cacbon dioxide khí thải và hàm lượng oxy được đo. Khi glucoza ban đầu đã cạn kiệt, bắt đầu nạp liên tục glucoza/sophorose. Cùng lúc đó, nhiệt độ được giảm xuống và được kiểm soát ở 28°C, độ pH tăng và được kiểm soát ở mức 4,5. Quy trình lên men kết thúc sau 140 giờ. Nước cấy được loại bỏ khỏi bể, và tế bào được loại bỏ bằng cách lọc. Sau khi tách tế bào, dung dịch lọc được cô đặc bằng cách lọc qua máy siêu lọc. Cuối cùng, dung dịch cô đặc được lọc vô trùng và được sử dụng để nghiên cứu tính ổn định trong tạo viên.

Mẫu enzym

Hoạt tính xylanaza của lớp bề mặt môi trường nuôi cấy từ MTP được đo bằng phương pháp đo hoạt tính xylanaza như được mô tả ở phần dưới. Lớp bề mặt môi

trường nuôi cấy được pha loãng 20 và 130 lần trong natri axetat 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0. 25 µl mẫu enzym pha loãng được trộn với 150 µl cơ chất WE-AX 0,5%, pH 5,0 và được ủ ở 30°C trong 15 phút và được lắc. Sau khi ủ, 45,4 µl mẫu phản ứng được trộn với 135 µl dung dịch PAHBAH và được ủ ở 95°C trong 5 phút trước khi được làm mát đến 20°C trong 10 giây. 100 µl mẫu được chuyển sang lỗ của đĩa vi chuẩn và đĩa được đọc tại 410 nm.

Hoạt tính được tính là giá trị trung bình của ba lần sao chép trừ đi trị trống bao gồm natri axetat 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0 thay vì enzym. Nồng độ protein của mẫu được tính dựa trên đường cong chuẩn của FveXyn4 được tinh chế (Số ID TRÌNH TỰ 1). Tất cả mẫu được pha loãng đến 50 ppm trong natri axetat 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0. Các mẫu chuẩn hóa này được sử dụng làm dung dịch gốc enzym trong các xét nghiệm được mô tả dưới đây.

Nồng độ protein trong dung dịch gốc enzym được đo bằng HPLC như được mô tả dưới đây.

Hoạt tính xylanaza của dung dịch cô đặc được lọc vô trùng từ quy trình sản xuất quy mô lớn được đo bằng xét nghiệm hoạt tính sau đây. 0,5 g mỗi dung dịch cô đặc được cân trong bình định mức 100 ml, tiếp theo là đổ đầy thể tích với dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0. Các mẫu được pha loãng đến khoảng 6 XU/ml bằng cách sử dụng dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0. 100 µl mẫu đã pha loãng được thêm vào 1 ml dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0 trong ống nghiệm và được cân bằng ở 40°C trong 2 phút. Viên Xylazyme (100 mg) được bổ sung để khởi tạo phản ứng và mẫu được ủ ở 40°C trong 10 phút trước khi phản ứng dừng lại bằng cách thêm 10 ml Tris 2%, pH 12,0. Dung dịch được pha trộn bằng máy vortex, để yên trong 5 phút và trộn lần nữa trước khi ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút. Khả năng hấp thụ lớp bề mặt được đo tại 590 nm. Mỗi mẫu được đo hai lần. Hoạt tính xylanaza được định lượng tương đối so với tiêu chuẩn enzym (Danisco Xylanaza, đã có tại Danisco Animal Nutrition).

Enzym chuẩn Econase® XT được bán trên thị trường và được lấy từ các mẫu được điều chế thành dạng khô thương mại. Thành phần xylanaza từ các mẫu được điều chế thành dạng khô thương mại Econase® XT được chiết xuất trong 33% (khối lượng/khối lượng) huyền phù đặc bằng cách sử dụng dung dịch đệm McIlvain, pH 5,0. Phần chiết được làm sạch bằng cách ly tâm (3000 RCF trong 10 phút) và được lọc bằng đầu lọc cho ống tiêm PALL Acrodisc PF (màng Supor 0,8/0,2 µm) và sau đó được làm nóng trong 20 phút ở 70°C. Sau khi loại bỏ chất kết tủa bằng cách ly tâm (38 724 RCF trong 15 phút),

dung dịch đệm được thay thế bằng đường dẫn đi qua cột Sephadex G25 (PD10 từ Pharmacia) được cân bằng với Na xitrat 20 mM, NaCl 20 mM, pH 3,4. Tinh chế thành phần xylanaza được thực hiện bằng cách sử dụng nhựa Source 15S, tiếp theo là rửa giải với gradien muối tăng tuyến tính (NaCl trong dung dịch đệm Na xitrat 20 mM, pH 3,4).

Econase XT® là endo-1,4- β -xylanaza (EC 3.2.1.8) được sản xuất bởi dòng *Trichoderma reesei* RF5427 (CBS 114044), hiện có tại ABVista.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo sự hấp thụ tại 280 nm. Hệ số tắt là sự ước lượng từ trình tự axit amin. Đối với Econase XT, sự hấp thụ tại 280 nm của 1 mg/ml được tính bằng 2,84 AU.

Xác định protein bằng HPLC

MTP (Agilent phần số 5042-1385) chứa dung dịch gốc enzyme 100 μ l với nồng độ khoảng 50 ppm cho mỗi lọ được sử dụng cho phương pháp xác định protein Tinh chế sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Agilent 1260 hoặc 1290 (Hewlett Packard) cho HPLC được trang bị cùng với cột Acuity UPLC BEH 125 SEC (Waters) được sử dụng để tách chất nhiễm bẩn còn lại. Mẫu được rửa giải từ cột bằng cách sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 25 mM, pH 6,8, chứa natri clorua 250 mM. Khả năng hấp thụ được đo tại 220 nm, được tích hợp bằng cách sử dụng phần mềm ChemStation (Công nghệ Agilent) và nồng độ protein của mẫu được xác định dựa trên đường cong chuẩn của protein/enzyme FveXyn4 được tinh chế có trình tự axit amin có Số ID TRÌNH TỰ 1.

Đo hoạt tính xylanaza

Hoạt tính xylanaza của mẫu enzyme được xác định bằng cách đo lượng đường khử được giải phóng từ lúa mì được thủy phân WE-AX (arabinoxylan tan trong nước). Lượng đường khử được đo bằng phương pháp PAHBAH. Tóm lại, do điều kiện nhiệt và kiềm, các nhóm mạch cuối khử phản ứng với PAHBAH không màu (Hydrazit axit 4-Para-Hydroxybenzoic), theo đó PAHBAH được oxy hóa và khả năng hấp thụ được đo tại 410 nm (Lever, 1972).

Cơ chất WE-AX 0,5%, pH 5,0 được điều chế bằng cách làm ẩm 0,25 g arabinoxylan lúa mì tan (ví dụ Megazyme, độ nhớt cao ~43 cSt, P-WAXYH) với 2,5 ml etanol 96%, trước khi bổ sung 50 ml natri axetat 0,1 M, pH 5,0. Việc xác định hoạt tính tiêu chuẩn được thực hiện tại pH 5,0. Để đo tại giá trị pH khác, 50 ml natri axetat 0,1 M, pH 5,0 được thay thế bằng dung dịch đệm chỉ định. Dung dịch được đun nóng trong khi khuấy cho đến lúc sôi, và được làm mát trong khi khuấy đến nhiệt độ phòng.

Dung dịch PAHBAH được điều chế bằng cách trộn dung dịch gốc PAHBAH 5% (4-Hydroxybenzhydrazit, ví dụ Sigma-Aldrich H9882) trong HCl 0,5M với NaOH 0,5 M với tỷ lệ 1:4 (thể tích/thể tích). Dung dịch được điều chế vào ngày phân tích và được bảo vệ tránh ánh sáng.

Mẫu enzym được pha loãng trong dung dịch đệm chỉ định đến nồng độ 1 ug/ml trước khi phân tích. 25 µl mẫu enzym pha loãng được trộn với 150 µl cơ chất WE-AX 0,5%, pH 5,0 và được ủ ở 30°C trong 15 phút và được lắng. Sau khi ủ, 45,4 µl mẫu phản ứng được trộn với 135 µl dung dịch PAHBAH và được ủ ở 95°C trong 5 phút trước khi được làm mát đến 20°C trong 10 giây. 100 µl mẫu được chuyển sang lỗ của đĩa vi chuẩn và đĩa được đọc tại 410 nm.

Hoạt tính được tính là giá trị trung bình của ba lần sao chép trừ đi trị trống bao gồm dung dịch đệm pha loãng thay vì enzym.

Xét nghiệm đo độ ổn định nhiệt

Mức độ cải biến do nhiệt của các biến thể FveXyn4 được đo bằng cách pha loãng và ủ trước các mẫu enzym trong dung dịch đệm MES 25 mM (Tween 80 0,00125% – dung dịch đệm MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 0,00125% (Thể tích:Thể tích)), pH 6,0 trong 10 phút ở các nhiệt độ khác nhau (lần lượt là 66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6, và 85°C) và sau đó đo hoạt tính còn lại bằng phương pháp hoạt tính xylanaza được mô tả ở phần trên. Hoạt tính đo được mà không ủ trước được đặt là 100% và hoạt tính còn lại của từng biến thể ở mỗi nhiệt độ được tính tương quan với hoạt tính này. Giá trị Tm được tính theo các mức độ cải biến do nhiệt, là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại.

Đường cong pH

Đường cong pH của biến thể FveXyn4 được nghiên cứu bằng cách đo hoạt tính tại độ pH 4,0, 5,0 và 6,0. Hoạt tính được đo về cơ bản như đã mô tả trong phương pháp hoạt tính xylanaza được mô tả bên trên. Các mẫu enzym được pha loãng trong Na-Axetat 0,1 M, pH 4,0, Na-Axetat 0,1 M, pH 5,0, BSA 0,1% (ví dụ Sigma A7906), hoặc dung dịch đệm McIlvaine, pH 6,0 cho hoạt tính lần lượt tại pH 4,0, 5,0 hoặc 6,0 trước khi phân tích. Cơ chất WE-AX 0,5% tại pH 4,0 và 6,0 được điều chế như đã mô tả cho cơ chất WE-AX 0,5%, pH 5,0, mặc dù natri axetat 0,1 M, pH 5,0 lần lượt được thay thế bằng Na-Axetat 0,1 M, pH 4,0 hoặc dung dịch đệm McIlvaine, pH 6,0. Tất cả dữ liệu được tính đều liên quan đến FveXyn4 tại pH 5,0.

Hòa tan pentosan (hòa tan AXinsol)

Cơ chất được sử dụng để đo sự hòa tan pentosan bằng các biến thể FveXyn4 là DDGS ngô và vỏ cám lúa mì. 100 mg DDGS ngô hoặc vỏ cám lúa mì với kích thước hạt < 212 µm được chuyển sang ống Eppendorf 2 ml và khối lượng chính xác được ghi lại. 750 µl dung dịch đệm ủ (HEPES 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0) and 900 µl cloramphenicol (40 µg/ml trong dung dịch đệm ủ) được bổ sung. Liều lượng enzym tăng được thêm vào để tổng thể tích là 1,8 ml.

Mỗi mẫu được xét nghiệm theo cặp đôi song song với mẫu đối chứng (không có enzym). Các mẫu được ủ ở 40°C kết hợp với lắc. Sau 18 giờ ủ, lớp bề mặt được lọc bằng bản lọc 96 lỗ (Pall Corporation, Bản lọc 96 lỗ AcroPrep, thủy tinh 1,0 µm, NTRL, lỗ 1 mL). Sau khi lọc, các mẫu được lưu trữ ở 4°C đến khi phân tích tổng lượng đường C5, arabinoza và xyloza.

Định lượng đường C5 (pentosan)

Tổng lượng pentoza đã đưa vào dung dịch được đo bằng phương pháp Rouau và Surget (1994) với thiết bị phun dòng liên tục. Lớp bề mặt được xử lý bằng axit để thủy phân polysacarit thành đường đơn. Phloroglucinol (1, 3, 5-trihydroxybenzen) được bổ sung để phản ứng với monopentoza và monohexoza, tạo ra phức hợp màu.

Bằng cách đo sự chênh lệch về khả năng hấp thụ tại 550 nm so với 510 nm, lượng pentoza trong dung dịch được tính bằng đường cong chuẩn. Không như phức hợp pentoza-phloroglucinol, khả năng hấp thụ phức hợp hexoza-phloroglucinol là không đổi tại các bước sóng này. Glucoza được thêm vào dung dịch phloroglucinol để tạo ra tín hiệu glucoza không đổi và còn đảm bảo không có sự can thiệp từ đường hexoza. Nồng độ pentoza trong các mẫu được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn xyloza.

Giảm độ nhớt trong xét nghiệm mẫu động vật trong ống nghiệm

Giảm độ nhớt trên lúa mì được xác định bằng phiên bản được điều chỉnh của quy trình được Bedford & Classen mô tả (1993 Poultry Sci. (Khoa học gia cầm), 72, 137-143). 3,6 mL dung dịch pepsin (2000 U/mL trong HCl 0,1 N) được trộn với 2,4 g lúa mì trước khi bổ sung lượng xylanaza chỉ định (biến thể FveXyn4), tiếp theo là ủ 45 phút ở 40°C. Sau đó 1,2 ml dung dịch tụy (8 mg/mL trong MES 1 M, pH 6,8) được trộn thành huyền phù đặc tạo độ pH cuối cùng là 6,0. Mẫu được phép ủ trong 60 phút ở 40°C kết hợp với trộn sau 30 và 60 phút. Sau đó mẫu được đặt trên nước đá trong 5 phút để ngừng phản ứng và được ly tâm trong 10 phút tại 3320 RFC, tiếp theo là lọc qua bộ lọc 0,45 µm để thu được lớp bề mặt trong. Sau đó độ nhớt mẫu được đo ở 20°C bằng máy đo độ nhớt số

Brookfield (mẫu DV-I+, Phòng thí nghiệm kỹ thuật Brookfield, MA 02172, Hoa Kỳ) được lắp côn CPE-40 và đĩa. Mỗi điểm dữ liệu là mức trung bình của ba lần lặp lại.

Tính ổn định trong tạo viên

Thử nghiệm tạo viên được thực hiện ở quy mô toàn diện tại Viện Công nghệ, Kolding, Đan Mạch. Mỗi dung dịch cô đặc xylanaza được lọc vô trùng được lập công thức trên lúa mì và được trộn thành hỗn hợp thức ăn chăn nuôi ngô/đậu nành (61,1% ngô, 31,52% đậu nành Hipro 48, 4,00% dầu đậu nành, 0,40% natri bicacbonat, 0,25% vitamin/khoáng chất Leghennen, 0,20% DL-methionin, 1,46% đicanxi phosphat, 1,16% đá vôi). Hỗn hợp sơ chế được điều chế bằng cách trộn biến thể xylanaza được lập công thức trên lúa mì thành 10 kg hỗn hợp thức ăn chăn nuôi ngô/đậu nành và được trộn trong 10 phút. Sau đó hỗn hợp sơ chế được bổ sung vào 120 kg thức ăn chăn nuôi và được trộn trong 10 phút trước khi xử lý với nước và nhiệt. Thức ăn được xử lý với nước và nhiệt trong 30 giây ở 90 và 95°C trước khi tạo viên. Dịch ngâm và viên thức ăn chăn nuôi thu được được nghiền bằng cách sử dụng máy nghiền trong phòng thí nghiệm Perten (điều quan trọng là tất cả mẫu đều được nghiền cùng lúc), trước khi hoạt tính xylanaza trong các mẫu được phân tích theo phương pháp chiết xuất hoặc huyền phù đặc được mô tả bên dưới bằng cách sử dụng arabinoxylan liên kết ngang azurine từ lúa mì (ví dụ viên Xylazyme, Megazyme, Ireland) làm cơ chất.

Phương pháp chiết xuất: 5,0 g mẫu đã nghiền được trộn với 50 ml dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0 và được khuấy trên máy khuấy từ trong 10 phút. Phần chiết xuất được lọc qua giấy lọc sợi thủy tinh và được pha loãng 3-6 lần trong 50 ml dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0. 100 µl phần chiết xuất đã pha loãng được trộn với 400 µl dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0 và được cân bằng ở 50°C trong 2 phút. Viên Xylazyme (60 mg) được bổ sung để khởi tạo phản ứng và mẫu được ủ ở 50°C trong 60 phút trước khi phản ứng dừng lại bằng cách thêm 5 ml Tris 2%, pH 12,0. Dung dịch được trộn bằng máy vortex, để yên trong 5 phút và trộn lần nữa trước khi ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút. Khả năng hấp thụ lớp bề mặt được đo tại 590 nm. Mỗi mẫu được đo hai lần.

Hoạt tính xylanaza được định lượng bằng cách sử dụng đường cong chuẩn xylanaza được xây dựng bằng cách sử dụng mỗi biến thể xylanaza trên dịch ngâm rỗng (không có enzym) và thức ăn chăn nuôi 90°C. Xylanaza được lập công thức theo lúa mì tương ứng được chiết xuất trong 10 phút trong dung dịch đệm Mc Ilvaine, pH 5,0 để thu được nồng độ 160 XU/mL. Phần chiết xuất được lọc qua giấy lọc sợi thủy tinh và sau đó bổ sung 0, 200, 400, 600, 800, và 1000 µl chiết xuất vào 5,0 g mẫu dịch ngâm rỗng được nghiền và thức ăn

chăn nuôi ở 90°C. Hoạt tính xylanaza trong các mẫu tiêu chuẩn này được đo như đã mô tả trong phương pháp chiết xuất trên. Mỗi đường cong chuẩn được tạo một lần.

Phương pháp huyền phù đặc: 1,0 g mẫu đã nghiền được trộn với 50 ml dung dịch đệm McIlvaine, pH 5,0 và được khuấy trên máy khuấy từ trong bể điều nhiệt ở 50°C trong 2 phút. Viên Xylazyme (100 mg) được bổ sung để khởi tạo phản ứng và mẫu được ủ kết hợp với khuấy ở 50°C trong 20 phút (30 phút cho Biến thể B). Sau khi ủ, các mẫu được lọc qua giấy lọc sợi thủy tinh và khả năng hấp thụ lớp bề mặt được đo ở 590 nm. Mỗi mẫu được đo hai lần.

Hoạt tính xylanaza được định lượng bằng cách sử dụng đường cong chuẩn xylanaza được tạo dựng cho mỗi biến thể xylanaza trên thức ăn chăn nuôi dịch ngâm rỗng (không có enzym). Xylanaza được lập công thức theo lúa mì tương ứng được chiết xuất trong 10 phút trong dung dịch đệm Mc Ilvaine, pH 5,0 để thu được nồng độ 30 XU/mL. Phần chiết xuất được lọc qua giấy lọc sợi thủy tinh và sau đó bổ sung 0, 200, 400, 600, 800, và 1000 µl vào 1,0 g mẫu thức ăn chăn nuôi dịch ngâm rỗng được nghiền. Hoạt tính xylanaza trong các mẫu tiêu chuẩn này được đo như đã mô tả trong phương pháp huyền phù đặc ở trên. Mỗi đường cong chuẩn được tạo dựng một lần.

Kết quả thu hồi đo được trong thức ăn chăn nuôi dịch ngâm được thiết lập là 100% và hoạt tính còn lại của thức ăn chăn nuôi ở nhiệt độ 90 và 95°C được tính liên quan đến giá trị này.

Kết quả và biện luận

Sau thí nghiệm quan trọng, 5 biến thể của xylanaza khung FveXyn4 được nhận dạng.

5 biến thể đều chịu nhiệt tốt hơn nhiều so với phân tử chuẩn/mẹ, FveXyn4, như được minh họa trong Hình 11.

Sự biểu thị đặc điểm hơn nữa của biến thể về tính chất sinh hóa và hiệu suất có tính chất rất quan trọng đối với xylanaza sẽ được sử dụng, ví dụ, trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi đã nhận dạng các biến thể này là các biến thể đều có tính bền nhiệt và có hoạt tính sinh hóa/hiệu suất cao.

Bảng 1. Tổng quan về đột biến trong 5 biến thể FveXyn4	
Biến thể	Đột biến
A	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_K79Y_S89G_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
B	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_T103M_V115L_N147Q

	G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
C	N7D_N25P_T33V_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
D	N7D_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
E	N7D_N25P_T33V_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
Việc đánh số dựa trên trình tự trưởng thành của FveXyn4. Số ID TRÌNH TỰ 1.	

Hình 11 mô tả giá trị T_m của 5 biến thể A, B, C, D, và E so với FveXyn4. Giá trị T_m được đo là nhiệt độ mà tại mức nhiệt độ này thu được 50% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ.

Hình 12 mô tả đường cong pH của 5 biến thể được đo tại pH bằng 4,0, 5,0 và 6,0 và tất cả dữ liệu liên quan đến kiểu đại tại pH 5,0. Tất cả 5 biến thể có đường cong pH lý tưởng để sử dụng, ví dụ, trong các ứng dụng thức ăn chăn nuôi.

Hình 13a và 13b minh họa lần lượt đường cong đáp ứng liều lượng về sự hòa tan pentosan từ DDGS ngô và vỏ cám lúa mì bởi 5 biến thể. Tất cả 5 biến thể cho thấy khả năng hòa tan arabinoxylan (pentosan) cao từ cả DDGS và vỏ cám lúa mì và tất cả đều ở cùng mức như phân tử kiểu đại. Tất cả 5 biến thể đều rất phù hợp để sử dụng, ví dụ, trong thức ăn chăn nuôi.

Hình 14 minh họa sự giảm độ nhớt trong "Giảm độ nhớt trong xét nghiệm mẫu động vật trong ống nghiệm" như được trình bày trong Ví dụ 1. Tất cả 5 biến thể cho thấy khả năng giảm độ nhớt cao và tất cả đều ở cùng mức như phân tử kiểu đại và tốt hơn nhiều so với Econase XT chuẩn.

Hình 15 minh họa sự thu hồi xylanaza trong thức ăn chăn nuôi sau khi tạo viên tại 90 và 95°C. Tất cả 5 biến thể đều cho thấy khả năng thu hồi xylanaza cao sau khi tạo viên và cao hơn kiểu đại đáng kể.

Ví dụ 2

Tách dòng xylanaza khung (mẹ) *Fusarium verticillioides* (FveXyn4)

ADN của bộ gen được phân lập từ dòng *Fusarium verticillioides* được sử dụng để khuếch đại gen xylanaza. Trình tự gen được tách dòng, gọi là gen FveXyn4, được biểu thị trong Số ID TRÌNH TỰ 2. Protein trưởng thành được mã hóa bởi gen FveXyn4 được biểu thị trong Số ID TRÌNH TỰ 1. Sản phẩm protein của gen FveXyn4 thuộc về họ glycosyl hydrolaza 10 (GH10) dựa trên nghiên cứu PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Ví dụ 3

Biểu hiện của protein khung FveXyn4 (mẹ)

Gen *FveXyn4* được khuếch đại từ ADN của bộ gen của *Fusarium verticillioides* bằng các đoạn mồi sau đây: Đoạn mồi 1 5'-caccATGAAGCTGTCTTCTTTCCTCTA-3' (Số ID TRÌNH TỰ 22), và Đoạn mồi 2 5'-TTTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (Số ID TRÌNH TỰ 23). Sản phẩm PCR được tách dòng thành vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen K2400) để tạo plasmit pEntry *FveXyn4*. Thu được plasmit biểu hiện pZZH254 bằng phản ứng tách dòng Gateway giữa plasmit pEntry *FveXyn4* và vector biểu hiện pTrex3gM (được mô tả trong 2011/0136197 A1 Hoa Kỳ) bằng cách sử dụng bộ kit enzym Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen 11791). Sơ đồ plasmit pZZH254 được cung cấp trong Hình 16. Trình tự của gen *FveXyn4* được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (Số ID TRÌNH TỰ 2). Plasmit pZZH254 được biến nạp thành dòng *Trichoderma reesei* được loại bỏ một phần tử (được mô tả trong WO 05/001036) bằng phương pháp biolistic (bắn gen) (Te'o VS và cộng sự, J Microbiol Methods (Tập chí phương pháp vi sinh vật học), 51:393-9, 2002).

Sau khi xác nhận trình tự, thể nguyên sinh của dòng *T. reesei* được loại bỏ một phần tử (được mô tả trong WO 05/001036) được biến nạp với plasmit biểu hiện pZZH254 bằng phương pháp thể nguyên sinh PEG (Penttila và cộng sự, *Gene*, 61:155-164, 1987). Để điều chế thể nguyên sinh, các bào tử được nuôi cấy trong 10 giờ ở 24°C trong môi chất tối thiểu (MM) *Trichoderm* (20 g/l glucoza, 15 g/l KH_2PO_4 , pH 4,5, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml dung dịch nguyên tố vi lượng *T. reesei* 1000X (175 g/l axit xitric khan, 200 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/l CuSO_4 , 1,4 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, và 0,8 g/l axit boric). Bào tử nảy mầm thu được bằng cách ly tâm và được xử lý với dung dịch Vinoflow FCE 30 mg/mL (Novozymes, AG Thụy Sĩ) trong khoảng thời gian từ 7 giờ đến qua đêm ở 30°C với tốc độ 100 vòng/phút để dung dịch giải thành tế bào nấm. Thể nguyên sinh được rửa trong dung dịch đệm Tris HCL 0,1 M (pH 7) chứa sorbitol 0,6 M và được tái huyền phù trong dung dịch đệm Tris HCL 10 mM (pH 7,5) chứa sorbitol 1,2 M và canxi clorua 10 mM. Để biến nạp PEG, khoảng 1 µg ADN và $1-5 \times 10^7$ thể nguyên sinh trong tổng thể tích 200 µl được xử lý với 2 ml dung dịch PEG 25%, được pha loãng với 2 thể tích sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH 7,5/dung dịch CaCl_2 10 mM. Thể biến nạp được chọn trong môi chất chứa axetamid là nguồn nitơ duy nhất (axetamid 0,6 g/L; xesi clorua 1,68 g/L; glucoza 20 g/L; kali dihydro phosphat 15 g/L; magie sulfat heptahydrat 0,6 g/L; canxi clorua dihydrat 0,6 g/L; sắt (II) sulfat 5 mg/L; kẽm sulfat 1,4 mg/L; coban (II) clorua 1 mg/L; mangan (II) sulfat 1,6 mg/L; thạch 20 g/L; pH 4,25). Các cụm dòng tế bào biến nạp (khoảng 50-100) xuất hiện trong khoảng 1 tuần. Sau khi tăng

trưởng trên đĩa axetamit, các bào tử được thu hồi và chọn lựa lại trên đĩa axetamit. Sau 5 ngày, các bào tử được thu hồi bằng cách sử dụng glyxerol 10% và 1×10^8 bào tử được cấy truyền trong bình lắc 250 ml với 30 ml môi chất xác định glucoza/sophorose để biểu hiện protein. Biểu hiện protein được xác nhận bởi SDS-PAGE. Sau đó huyền phù bào tử được nuôi cấy trong thùng lên men 7 L trong môi chất xác định chứa thức ăn chăn nuôi glucoza-sophorose 60%. Môi chất xác định glucoza/sophorose (cho mỗi lít) bao gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, dung dịch đệm PIPPS 33 g, axit casmino 9 g, KH_2PO_4 4,5 g, CaCl_2 (khan) 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, pH đến 5,5 được điều chỉnh với NaOH 50% với Milli-Q H_2O để đạt 966,5 mL. Sau khi tiệt trùng, các thành phần sau được thêm vào: 26 mL Glucoza/Sophrose 60%, và 2,5 mL kim loại vi lượng *T. reesei* 400X.

FveXyn4 được tinh chế từ dịch lên men đậm đặc của môi trường lên men 7L bằng cách sử dụng 2 cột sắc ký. Dịch lên men đậm đặc được đệm trong dung dịch đệm natri phosphat 20 mM, pH 6,0 chứa amoni sulfat 1 M được nạp trên cột sắc ký tương tác kỵ nước (Sephacrose Phenyl FF, 26/10). Protein được rửa giải từ cột bằng cách sử dụng gradien tuyến tính của dung dịch đệm rửa/cân bằng cho đến dung dịch đệm natri phosphat 20 mM, pH 6,0. Phần cắt chứa protein FveXyn4 được đưa lên cột lọc gel (HiLoad Superdex 75 pg 26/60), và pha động được sử dụng là natri phosphat 20 mM, pH 7,0 chứa NaCl 0,15 M. Protein tinh chế được cô đặc bằng thiết bị 3K Amicon Ultra-15 và phần cắt protein đậm đặc được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Trình tự nucleotit của gen *FveXyn4* được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 24. Trình tự tín hiệu được tô đậm (chữ hoa), và intron dự đoán được tô đậm và bằng chữ thường.

Trình tự axit amin của protein FveXyn4 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 26. Trình tự tín hiệu được phần mềm SignalP-NN dự đoán được gạch chân. Đây là pre-protein.

Trình tự axit amin của dạng trưởng thành của protein FveXyn4 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 1. Đây là dạng hoạt hóa của enzym. Số ID TRÌNH TỰ 27 cho biết pro-protein, nghĩa là trước khi điều hòa sau dịch mã. Tùy thuộc vào vật chủ, sự điều hòa sau dịch mã có thể thay đổi và vì thế sáng chế này cũng bao gồm các dạng hoạt hóa, trưởng thành của Số ID TRÌNH TỰ 27.

Ví dụ 4

Hoạt tính xylanaza của FveXyn4 (xylanaza mẹ)

FveXyn4 thuộc họ glycosyl hydrolaza 10 (GH10, số CAZy). Hoạt tính beta 1-4 xylanaza của FveXyn4 được đo bằng cách sử dụng xylan 1% từ gỗ bulô (Sigma

95588) hoặc arabinoxylan 1% từ bột lúa mì (Megazyme P-WAXYM) làm cơ chất. Xét nghiệm được thực hiện trong natri xitrat 50 mM, pH 5,3, dung dịch đệm Tween-80 0,005% ở 50°C trong 10 phút.

Đường khử được giải phóng được định lượng bằng phản ứng với axit 3, 5-Dinitrosalicylic và đo khả năng hấp thụ tại 540 nm. Hoạt tính enzym được định lượng tương quan với đường cong chuẩn xyloza. Trong xét nghiệm này, một đơn vị xylanaza (U) được xác định là lượng enzym yêu cầu để tạo ra 1 micromol đường lượng đường khử xyloza trong mỗi phút theo điều kiện của xét nghiệm.

Ví dụ 5

Đường cong nhiệt độ của FveXyn4 (xylanaza mẹ)

Nhiệt độ tối ưu của FveXyn4 tinh chế (enzym mẹ) được xác định bằng cách xét nghiệm hoạt tính xylanaza ở nhiệt độ thay đổi trong khoảng 40°C và 75°C trong 10 phút trong dung dịch đệm natri xitrat 50 mM tại pH 5,3. Hoạt tính được ghi nhận là hoạt tính tương đối trong đó hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu được thiết lập là 100%. Đường cong nhiệt độ của FveXyn4 được minh họa trong Hình 17. FveXyn4 được ghi nhận là có nhiệt độ tối ưu là 60°C, và được ghi nhận là giữ lại hơn 70% hoạt tính tối đa trong khoảng nhiệt độ giữa 45°C và 64°C.

Ví dụ 6

Giảm độ nhớt trong nguyên liệu có nguồn gốc từ hạt ngũ cốc (ví dụ trong sản xuất nhiên liệu sinh học)

Giảm độ nhớt lúa mì

Trong ngành công nghiệp cồn nhiên liệu châu Âu, các loại hạt ngũ cốc nhỏ như lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen là các nguyên liệu phổ biến, khác với Hoa Kỳ chủ yếu sử dụng ngô. Các hạt ngũ cốc nhỏ này chứa, sau tinh bột, polyme polysacarit không phải tinh bột (NSP) ở mức cao, như xenluloza, beta-glucan và hemixenluloza.

Tỷ lệ chiếm giữ của các NSP khác nhau là khác nhau trong từng nguyên liệu cấp. Bảng 1 cho biết lượng NSP khác nhau trong lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen so với các nguyên liệu cấp khác.

Bảng 1: Polysacarit không phải tinh bột có trong nguyên liệu cấp khác nhau (g kg⁻¹ chất khô) ^{1,2}

	Ngô	Lúa mì	Lúa mạch đen	Lúa mạch	Yến mạch

				Có vỏ	Bóc vỏ	Có vỏ	Bóc vỏ
Beta-Glucan	1	8	16	42	42	28	41
Xenluloza	22	17-20	15-16	43	10	82	14
NCP ³ tan và không tan.	75	89-99	116- 136	144	114	150	113
Tổng NSP	97	107- 119	132- 152	186	124	232	116

¹ (Bach Knudsen, 1997) Hàm lượng hydrat cacbon và lignin của nguyên liệu thực vật được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi. Anim. Feed Sci. Technol. (Công nghệ khoa học thức ăn chăn nuôi), 67 (4): 319-338

² Englyst, H. N., Anderson, V. và Cummings, J. H., 1983. Tinh bột và polysacarit không phải tinh bột trong một số thức ăn ngũ cốc. J. Sci. Food Agric. (Tạp chí khoa học thực phẩm và nông nghiệp), 34: 1434-1440.

³ Polysacarit không được tạo từ xenluloza: pentosan, (arabino)xylan và các hemixenluloza khác.

NSP tạo độ nhớt cao cho dịch ngâm ngũ cốc. Độ nhớt cao có ảnh hưởng không tốt đến sản xuất etanol do nó hạn chế nồng độ chất rắn có thể được sử dụng trong bước ủ rượu và sẽ làm giảm hiệu suất năng lượng của quy trình. Ngoài ra, hemixenluloza còn lại có mặt trong toàn bộ quy trình có thể góp phần làm tắc nghẽn bộ trao đổi nhiệt và thiết bị chưng cất. Tác động lớn nhất nhìn thấy được của độ nhớt cao là khi dịch ngâm được làm mát tới nhiệt độ lên men (32°C). Điều này giải thích rằng độ nhớt cần phải được giảm trong quy trình ở giai đoạn bất kỳ trước bước làm mát. Tùy thuộc vào quy trình được sử dụng, enzyme cần phải hoạt động ở 60°C và/hoặc 85°C.

Có thể thêm enzyme giảm độ nhớt vào các giai đoạn khác nhau của quy trình sản xuất etanol: giai đoạn trộn và/hoặc giai đoạn đường hóa/lên men. Tốt nhất là bổ sung enzyme trong giai đoạn trộn để phá vỡ độ nhớt ban đầu.

Việc sử dụng enzyme giảm độ nhớt trong quy trình sản xuất etanol mang lại nhiều lợi ích:

- Có thể sử dụng dịch ngâm có hàm lượng chất khô cao hơn trong quy trình
- Có thể đạt được hàm lượng chất rắn cao hơn trong xi-rô cuối
- Truyền nhiệt tốt hơn, yêu cầu ít năng lượng hơn
- Giảm tắc nghẽn máy bay hơi, dẫn tới giảm chi phí vệ sinh
- Tăng sản lượng etanol hoàn thiện
- Nâng cao chất lượng DDGS

Phương pháp

Máy phân tích độ nhớt nhanh (RVA 4500) của Perten Instruments được sử dụng để đo độ nhớt của dịch ngâm lúa mì. Dịch ngâm lúa mì này được điều chế theo quy trình sau:

Điều chế 60 gam huyền phù đặc lúa mì DS 30% (hiện tại là 34,65%) (cho các lần thực hiện trên 2 máy RVA cùng lúc) như sau:

- Cân 20,80 gam lúa mì
- Trong cốc bêse 100 ml, cân 39,20 gam nước máy và thêm 137 μl H_2SO_4 4N
- Thêm lúa mì vào nước và khuấy trong 5 phút với tốc độ tối đa (khoảng 500 vòng/phút) bằng máy khuấy đĩa
- Chuyển 25,0 gam huyền phù đặc sang cốc RVA, thêm enzym được pha loãng gấp 50 lần và bắt đầu chạy máy RVA (kiểm tra xem độ pH ban đầu có phải bằng khoảng 5,3 không)
- Kiểm tra độ pH khi kết thúc chạy RVA (5,6-5,7)

Trong mỗi thí nghiệm (25 gam huyền phù đặc), xylanaza được định lượng tại 25 μg protein (cho mỗi 8,66 g lúa mì 'hiện tại'), tương ứng với 2,9 μg protein / g lúa mì 'hiện tại'. SPEZYME® CL được định lượng tại 150 mg/kg (0,15 kg/MT) lúa mì 'hiện tại' (2,2 AAU/g 'hiện tại' hoặc 2,6 AAU/g DS).

Sự hóa lỏng lúa mì chuẩn được mô phỏng trong RVA. Việc xử lý trước được thực hiện trong 20 phút ở 60°C, tiếp theo là bước hóa lỏng trong 30 phút ở 85°C. Sau khi xử lý trước và hóa lỏng, huyền phù đặc được làm mát đến 32°C để xác định độ nhớt ở điều kiện lên men. Độ pH hóa lỏng được duy trì trong khoảng 5,3-5,7.

Trong thí nghiệm này, hiệu suất của FveXyn4 được so sánh với Biến thể A, B, C, D và E.

	Độ nhớt (mPa.s)						
	Trị trọng (n=2)	FveXyn4	Biến thể A	Biến thể B	Biến thể C	Biến thể D	Biến thể E
Sau khi xử lý trước (thời gian xử lý là 1200 giây)	533 $\pm$ 16	206	220	232	224	235	240
Sau khi hóa lỏng (thời gian xử lý là 3120 giây)	347 $\pm$ 16	122	125	135	130	141	145

Tại nhiệt độ lên men (thời gian xử lý là 3660 giây)	765 ± 20	250	257	282	275	302	298
--	----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Các kết quả được trình bày như trên và trong Hình 22.

Dữ liệu này cho thấy Fve Xyn4 và các biến thể hoạt động theo cùng phương thức, cho thấy mức giảm độ nhớt 55-67% so với trị trống (chỉ dành cho SPEZYME® CL).

Ví dụ 7

Tách gluten-tinh bột lúa mì

Quy trình tách bột lúa mì thành phần cắt tinh bột và gluten được áp dụng công nghiệp trên quy mô lớn để thu được tinh bột A và phụ phẩm tinh bột B và bột gluten chất lượng cao. Quy trình tách được cải thiện bằng cách bổ sung xylanaza.

7.1 Nguyên liệu và phương pháp

Thí nghiệm sau đây mô phỏng sự tách tinh bột lúa mì của quy trình bột nhào ở 40°C. Trong thí nghiệm này, thêm bột lúa mì công nghiệp (Cargill) vào nước máy được làm nóng trước (50°C) để tạo ra huyền phù đặc DS 35% bằng cách trộn trong 1 phút trong máy trộn nhà bếp (Braun). Độ pH của huyền phù đặc duy trì như 'hiện tại' là ~6,1. 100 gam huyền phù đặc này được chuyển sang máy đo độ nhớt Haake VT550 được hiệu chuẩn ở 40°C. Sau 1 phút ủ, dung dịch enzym được thêm vào huyền phù đặc. Trong khi đó, độ nhớt được theo dõi trước và sau khi thêm enzym trong tổng cộng là 15 phút. Sau khi ủ, nhân ba các mẫu của huyền phù đặc được ủ và một mẫu huyền phù đặc ở t_0 được lấy đi để thực hiện thí nghiệm quay. Mỗi mẫu thí nghiệm quay có tổng khối lượng là 22,5 g, chứa 15,8-15,9 g mẫu huyền phù đặc, thêm 6,6-6,7 g ống ly tâm dùng một lần (15 ml). Tất cả mẫu đều được ly tâm trong máy ly tâm Hermle Z400 trong 15 phút với tốc độ 3500 vòng/phút. Giá trị Brix được xác định từ xi-rô của mẫu được ly tâm.

Ví dụ 8

Tách dòng xylanaza khung (mẹ) FoxXyn2 ở Fusarium oxysporum

Trình tự nucleotit của gen FoxXyn2 được phân lập từ *Fusarium oxysporum* được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 30 (Hình 4A). Trình tự tín hiệu được tô đậm, và intron dự đoán được trình bày bằng chữ thường in nghiêng.

Trình tự axit amin của protein FoxXyn2 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 29 (Hình 3A). Trình tự tín hiệu được trình bày bằng chữ nghiêng.

Trình tự axit amin của dạng trưởng thành của protein FoxXyn2 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 31 hoặc Số ID TRÌNH TỰ 4 (Hình 3B và 3C).

Sản phẩm protein của gen *FoxXyn2* thuộc về họ glycosyl hydrolaza 10. Điều này cho thấy rằng FoxXyn2 là glycosyl hydrolaza được tiết ra.

Ví dụ 9

Biểu hiện của protein FoxXyn2 khung (mẹ)

Gen *FoxXyn2* được khuếch đại từ ADN của bộ gen của *Fusarium oxysporum* bằng các đoạn mồi sau đây: Đoạn mồi 1 5'-ccggcgccgcaccATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACC-3' (Số ID TRÌNH TỰ:24), và Đoạn mồi 2 5'-ccggcgcgcccttaTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAG-3' (Số ID TRÌNH TỰ:25). Sau khi được xử lý bằng *Not I* và *Asc I*, sản phẩm PCR được tách dòng thành vectơ biểu hiện pTrex3gM (được mô tả trong 2011/0136197 A1 Hoa Kỳ) được xử lý với cùng enzyme giới hạn, và plasmit thu được được gắn nhãn pZZH135. Sơ đồ plasmit pZZH135 được minh họa trong Hình 18. Trình tự của gen *FoxXyn2* được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

Plasmit pZZH135 được biến nạp thành dòng *Trichoderma reesei* được loại bỏ một phần tử (được mô tả trong WO 05/001036, được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn) bằng phương pháp biolistic (bắn gen) (được trình bày trong Te'o VS và cộng sự, J Microbiol Methods (Tập chí phương pháp vi sinh vật học), 51:393-9, 2002). Protein được phân lập từ lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy sau khi lọc để thực hiện phân tích SDS-PAGE và xét nghiệm hoạt tính xylanaza để xác nhận biểu hiện enzym.

Trình tự nucleotit của gen *FoxXyn2* từ plasmit biểu hiện pZZH135 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 4. Trình tự axit amin của dạng trưởng thành của protein FoxXyn2 được đặt là Số ID TRÌNH TỰ 3.

Protein FoxXyn2 được tinh chế từ lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng nhựa sắc ký ái lực Blue Sepharose, 6FF và các mẫu được sử dụng để biểu thị đặc điểm sinh hóa như được mô tả trong các ví dụ tiếp sau đây.

Ví dụ 10

Hoạt tính xylanaza của FoxXyn2 khung (mẹ)

FoxXyn2 thuộc họ glycosyl hydrolaza 10 (GH10, số CAZy). Hoạt tính beta 1-4 xylanaza của FoxXyn2 được đo bằng cách sử dụng xylan 1% từ gỗ bulô (Sigma

95588) hoặc arabinoxylan 1% từ bột lúa mì (Megazyme P-WAXYM) làm cơ chất. Xét nghiệm được thực hiện trong natri xitrat 50 mM, pH 5,3, dung dịch đệm Tween-80 0,005% ở 50°C trong 10 phút.

Đường khử được giải phóng được định lượng bằng phản ứng với axit 3, 5-Dinitrosalicylic và đo khả năng hấp thụ tại 540 nm. Hoạt tính enzym được định lượng tương quan với đường cong chuẩn xyloza. Trong xét nghiệm này, một đơn vị xylanaza (U) được xác định là lượng enzym yêu cầu để tạo ra 1 micromol đường khử xyloza trong mỗi phút theo điều kiện của xét nghiệm.

Ví dụ 11

Đường cong nhiệt độ của FoxXyn2

Nhiệt độ tối ưu của FoxXyn2 tinh chế được xác định bằng cách xét nghiệm hoạt tính xylanaza ở nhiệt độ thay đổi trong khoảng 45°C và 94°C trong 10 phút trong dung dịch đệm natri xitrat 50 mM tại pH 5,3. Hoạt tính được ghi nhận là hoạt tính tương đối khi hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu được thiết lập là 100%. Đường cong nhiệt độ của FoxXyn2 được minh họa trong Hình 19. FoxXyn2 được ghi nhận là có nhiệt độ tối ưu là 60°C, và được ghi nhận là giữ lại hơn 50% hoạt tính tối đa ở nhiệt độ trong khoảng giữa 40°C và 65°C.

Ví dụ 12

Độ bền nhiệt

Độ bền nhiệt của kiểu đại FveXyn4 (wt) và biến thể của FveXyn4 được đo tại 63°C (xem dữ liệu trong Bảng 2). Có thể thấy rõ rằng tất cả biến thể thể hiện các số lượng (2-4) và tổ hợp đột biến khác nhau có hoạt tính còn lại cao hơn ở 63°C so với FveXyn4 và có thể kết luận rằng các biến thể này đều chịu nhiệt tốt hơn kiểu đại FveXyn4 (ví dụ, được trình bày trong bảng mô tả này là Số ID TRÌNH TỰ 1, hoặc Số ID TRÌNH TỰ 27).

Nguyên liệu và phương pháp

Các biến thể của FveXyn4 thu được từ thư viện tổ hợp hoặc bằng cách đưa vào đột biến đặc hiệu theo mô tả trong Ví dụ 1. Độ bền nhiệt của biến thể FveXyn4 được đo bằng cách pha loãng và ủ trước mẫu enzym trong dung dịch đệm MES 25 mM (Tween 80 0,00125% – dung dịch đệm MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 0,00125% (thể tích:thể tích)), pH 6,0 trong 10 phút ở 63°C. Sau khi ủ, hoạt tính còn lại được đo bằng phương pháp hoạt tính xylanaza được mô tả trong Ví dụ 1. Hoạt tính đo được mà không ủ trước được đặt là 100% và hoạt tính còn lại của từng biến thể ở mỗi mức nhiệt độ tương ứng được tính tương quan với hoạt tính này.

Bảng 2 trình bày 14 biến thể tổ hợp của FveXyn4 với độ ổn định nhiệt tăng đáng kể khi so sánh với kiểu đại FveXyn4. Độ bền nhiệt được đo là hoạt tính còn lại sau khi ủ trước ở 63°C trong 10 phút như đã mô tả ở trên trong phần Nguyên liệu và phương pháp của Ví dụ 12 này.

Bảng 2:		
Biến thể	Đột biến	Hoạt tính còn lại ở 63°C
FveXyn4	WT (Kiểu đại)	0,04
1	K79F_A217Q_T298F	0,89
2	N7D_T33V_A217Q_T298F	0,80
3	N7D_K79F_T298F	0,79
4	T33V_K79F_A217Q	0,77
5	N7D_T33V_T298Y	0,76
6	T33V_A217Q_T298Y	0,67
7	N7D_A217Q_T298F	0,65
8	N7D_T33V_A217Q	0,60
9	K79F_T298F	0,59
10	N7D_K79F	0,58
11	T33V_K79F	0,57
12	T33V_T298Y	0,55
13	N7D_T33V	0,40
14	T33V_A217Q	0,35

Tất cả văn bản được đề cập trong mô tả trên được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn. Các cải biến và biến đổi khác nhau của phương pháp và hệ thống của sáng chế được mô tả sẽ được các chuyên gia trong ngành hiểu rõ mà không tách rời khỏi phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả cùng với một số phương án ưu tiên cụ thể, nhưng cần hiểu rằng sáng chế như được yêu cầu bảo hộ không giới hạn trong các phương án cụ thể này một cách cứng nhắc. Thực tế, các cải biến khác nhau của các phương pháp được mô tả để thực hiện sáng chế mà các chuyên gia trong ngành sinh hóa và công nghệ sinh học hoặc các ngành liên quan coi là hiển nhiên cũng thuộc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể của enzym xylanaza GH10 có độ ổn định nhiệt được tăng cường so với enzym xylanaza GH10 gốc, xylanaza GH10 gốc có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất là 90% với trình tự axit amin có số ID TRÌNH TỰ 1, trong đó biến thể này đã được cải biến ở ít nhất hai hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí sau: 7, 33, 79, 217 và 298 tương ứng với việc đánh số axit amin cho số ID TRÌNH TỰ 1.

2. Biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm 1, trong đó cải biến được chọn trong số:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L hoặc M;

A217Q, E, P, D hoặc M; và/hoặc

T298Y, F hoặc W.

3. Biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm 1 hoặc 2, trong đó enzym xylanaza GH10 gốc còn được cải biến tại ít nhất một vị trí trong số các vị trí sau: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

4. Biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm 3, trong đó cải biến được chọn từ:

N25P;

S57Q, T hoặc V;

N62T hoặc S;

G64T hoặc S;

S89G, N, Q, L hoặc M;

T103M hoặc K;

V115E hoặc L;

N147Q;

G181Q, A, D hoặc P;

S193Y hoặc N, và/hoặc

G219D hoặc P.

5. Biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm 4, trong đó cải biến được chọn từ:

- i. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- ii. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q và T298Y.
- iii. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- iv. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P và T298Y;
- v. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q và T298Y;
- vi. K79F, A217Q và T298F;
- vii. N7D, T33V, A217Q và T298F;
- viii. N7D, K79F và T298F;
- ix. T33V, K79F và A217Q;
- x. N7D, T33V và T298Y;
- xi. T33V, A217Q và T298Y;
- xii. N7D, A217Q và T298F;
- xiii. N7D, T33V và A217Q;
- xiv. K79F và T298F;
- xv. N7D và K79F;
- xvi. T33V và K79F;
- xvii. T33V và T298Y;
- xviii. N7D, T33V; và
- xix. T33V và A217Q.

6. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

7. Vector chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 6.

8. Cấu trúc tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 6.

9. Vật chủ chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 6.

10. Vật chủ theo điểm 9, trong đó tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào nấm sợi, và tế bào thực vật.
11. Chế phẩm enzym chứa biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
12. Chế phẩm enzym theo điểm 11, trong đó chế phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm ít nhất một enzym proteaza, ít nhất một enzym amylaza, ít nhất một enzym phytaza và/hoặc enzym beta-glucanaza.
13. Chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi chứa biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
14. Chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi theo điểm 13, trong đó chế phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm ít nhất một enzym proteaza, ít nhất một enzym amylaza, ít nhất một enzym phytaza và/hoặc enzym beta-glucanaza.
15. Hỗn hợp trộn sẵn chứa biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và ít nhất một vitamin và/hoặc ít nhất một khoáng chất.
16. Thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm enzym theo điểm 11 hoặc 12, hoặc chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi theo điểm 13 hoặc 14.
17. Thức ăn gia súc chứa chế phẩm enzym theo điểm 11 hoặc 12, hoặc chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi theo điểm 13 hoặc 14.
18. Phương pháp phân giải arabinoxylan trong nguyên liệu chứa xylan, bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xylan này tiếp xúc với biến thể của enzym xylanaza GH10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc chế phẩm enzym theo điểm 11 hoặc 12, hoặc chế phẩm phụ gia dùng cho thức ăn chăn nuôi theo điểm 13 hoặc 14.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó arabinoxylan này là arabinoxylan không tan.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó nguyên liệu chứa xylan được chọn từ nhóm bao gồm thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn gia súc; thành phần của thức ăn chăn nuôi; nguyên liệu có nguồn gốc từ các hạt; dịch ngâm; dịch đường; mạch nha; lúa mạch đã tạo mạch nha; chất phụ trợ; dịch ngâm lúa mạch; và bột ngũ cốc.

21. Phương pháp điều chế biến thể của enzym xylanaza GH10 bao gồm các bước sau đây:

- a) biến nạp vật chủ bằng cấu trúc tái tổ hợp theo điểm 8 và
- b) nuôi cấy vật chủ biểu hiện ở bước (a) trong điều kiện cho phép biểu hiện biến thể của enzym xylanaza GH10.

22. Phương pháp sản xuất các sản phẩm lên men từ nguyên liệu chứa tinh bột bao gồm các bước sau:

- (a) hóa lỏng nguyên liệu chứa tinh bột bằng hỗn hợp enzym chứa biến thể của enzym xylanaza GH 10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5;
- (b) sacarit hóa sản phẩm ở bước (a);
- (c) lên men bằng vi sinh vật thích hợp; và
- (d) tùy ý, thu hồi sản phẩm được tạo ra ở bước (c).

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó các bước (b) và (c) được thực hiện đồng thời.

24. Phương pháp làm giảm độ nhớt của nguyên liệu chứa tinh bột đã hóa lỏng bao gồm cho huyền phù đặc của nguyên liệu chứa tinh bột tiếp xúc với biến thể của enzym xylanaza GH 10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

25. Phương pháp thủy phân arabinoxylan trong nguyên liệu có nguồn gốc từ các hạt bao gồm các bước sau:

- (a) cho nguyên liệu có nguồn gốc từ các hạt này tiếp xúc với chất lỏng; và
- (b) thủy phân arabinoxylan trong nguyên liệu có nguồn gốc từ các hạt bằng cách cho nguyên liệu có nguồn gốc từ các hạt tiếp xúc với biến thể của enzym xylanaza GH 10 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

HÌNH 1A

(SỐ ID TRÌNH TỰ 26)

mklsflytaslvaa***IPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN***
SGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK
VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN
YNPKPAYTAVVNALR

HÌNH 1B

(SỐ ID TRÌNH TỰ 27)

IPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP
SQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVG
GRYKGKIYAWDVVNEIFWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYS
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV
VNALR

HÌNH 1C

(SỐ ID TRÌNH TỰ 1)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQ
NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRIYAWDVVNEIFWDGTLRKDSHFNNVFG
NDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGAL
TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV
VNALR

HÌNH 2A

(SỐ ID TRÌNH TỰ 24)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
 TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
 GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCC
 AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA
 GTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA
 CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**Gtatgtttattccccagacttctt**
cgaaatgactttgctaacatgttcagGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCC
 GAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTC
 CGCGCCGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCG
 ACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCT
 CAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC
 GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTG
 CCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAA
 GGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAG
 AACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCC
 TGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 2B

(SỐ ID TRÌNH TỰ 25)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCCGGGCCATTCCCACCGCCA
 TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
 GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCC
 AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA
 GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA
 CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGAT
 CTTGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAAC
 GACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGC
 TGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTAT
 GGTTCCTCCGTCAAGAAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCT
 CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCG
 CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGC
 CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCA
 CCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTT
 CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 2C

(SỐ ID TRÌNH TỰ 2)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC
 TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCC
 GTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGAC
 CAGGTTGTCAACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT
 CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGAC
 TCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCC
 AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCC
 TCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC
 GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC
 ATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATC
 ACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAAC
 CCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 3A

(SỐ ID TRÌNH TỰ 28)

mklsflytaslvaa***IPTAIEPR***QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN
 SGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK
 VIENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP
 NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL
 ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN
 YNPKAAYTAVVNALR

HÌNH 3B

(SỐ ID TRÌNH TỰ 29)

IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP
 SQGKFNFSGFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVV
 GRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYS
 LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI
 TELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV
 VNALR

HÌNH 3C

(SỐ ID TRÌNH TỰ 3)

QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFAQQ
 NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG
 NDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGAL
 TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV
 VNALR

HÌNH 4A

SỐ ID TRÌNH TỰ 30

ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
 TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC
 ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG
 AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTAC
 CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG*gtatgtttcttcactcgaacttcttat*
*aaatggctttactaacaatgttcag*GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGA
 AAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCG
 CGCTGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGAC
 TCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCA
 GCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGC
 TGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCC
 ATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGG
 CCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAAC
 TCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTG
 CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 4B

SỐ ID TRÌNH TỰ 31

ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC
ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG
AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTAGTCTGGCACTCCCAGTCCCTCAG
TGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC
CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTAAACGAGATC
TTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA
CGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG
TTCCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTGACGGTATTGGTTCTCA
GACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC
AACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA
ACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACC
GTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCCG
ATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 4C

SỐ ID TRÌNH TỰ 4

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC
TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGGCGCC
GTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGAC
CAGGTCGTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCT
CAGTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTACCAACGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGAC
TCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTCGCTTCCGCGCTGCCCCGAAGGCTGACCCC
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCC
TCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC
GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC
ATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATC
ACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGATGCTAACTACAAC
CCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 5

SỐ ID TRÌNH TỰ 5

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGNFNFGSFDQVVNFAQQ
 NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRIYKGIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG
 NDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSASASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPVDGIGSQSHLDPGAAGQVQAL
 TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDSNYPKPAYTAV
 VNALR

HÌNH 6A

SỐ ID TRÌNH TỰ 32

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCCGAGAAGCTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
 GAGCCCAGCCAGGGCAAATTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCTGCAACTTTGCTCA
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG
 TGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTAC
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGtatgttttctgcctcgaccttctca
 aagatgaatttgctaacatgttcagGACGTGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCG
 AAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCC
 GCGCCGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGA
 CTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTC
 AGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGCTCACCTTGACCCCGGTGCCG
 CTGGCCAAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGC
 CATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCAAG
 GCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAA
 CTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCTTCTGTTGACTCCAACCTACAACCCCAAGCCT
 GCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 6B

(SỐ ID TRÌNH TỰ 33)

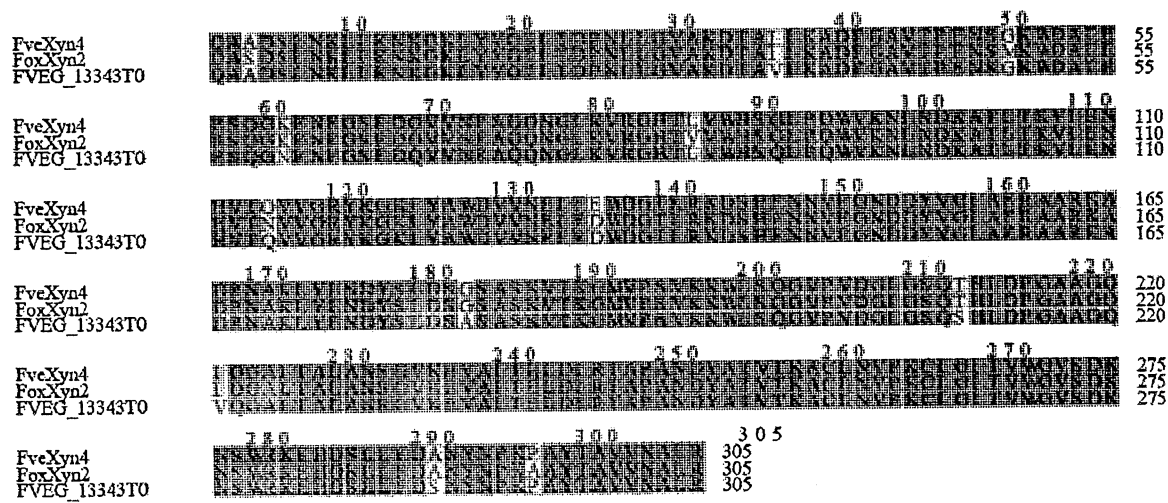
ATGAAGCTGTCTTCTTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
GAGCCCAGCCAGGGCAAATTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTGTCAACTTTGCTCA
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG
TGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCAC
CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCAACGAGATC
TTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA
TGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG
TCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCCA
GCTCTACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC
AACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCA
ACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCAC
CGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTC
GACTCCAACCTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 6C

(SỐ ID TRÌNH TỰ 6)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC
 TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTCATCAAGGCCGACTTTGGCGCC
 GTCACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGAC
 CAGGTCTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT
 CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGAT
 TCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCC
 AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCC
 TCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGTCTCACCTTGACCCCGGTGCC
 GCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC
 ATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATC
 ACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCGACTCCAAC TACAAC
 CCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 7



HÌNH 8

Số ID TRÌNH TỰ 7

> trình tự mã hóa enzym biến thể A (1 bp-987 bp, trực tiếp) 987 bp
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTAAAGACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCTGCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
 AGGACTCTCACTTCAACCAGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC
 AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTTGGCTCTCAGA
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGG
 AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
 CCGCTAA

Số ID TRÌNH TỰ 8

> trình tự mã hóa enzym biến thể B (1 bp-987 bp, trực tiếp) 987 bp
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG
 GGTAAAGACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCTGCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
 AGGACTCTCACTTCAACCAGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC
 AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTTGGCTCTCAGA
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGG
 AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
 CCGCTAA

HÌNH 8 tiếp theo

Số ID TRÌNH TỰ 9

> trình tự mã hóa enzym biến thể C (1 bp-987 bp, trực tiếp) 987 bp
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCTCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTACCCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
 AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
 AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG
 AGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
 CCGCTAA

Số ID TRÌNH TỰ 10

> trình tự mã hóa enzym biến thể D (1 bp-987 bp, trực tiếp) 987 bp
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTACCCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
 AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
 AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG
 AGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
 CCGCTAA

HÌNH 8 tiếp theo

Số ID TRÌNH TỰ 11

> trình tự mã hóa enzym biến thể E (trực tiếp) 987 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
 AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
 AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG
 AGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
 CCGCTAA

HÌNH 9

Số ID TRÌNH TỰ 12

>enzym biến thể A (121 bp-1159 bp, trực tiếp) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC
 AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
 AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACC GA
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

Số ID TRÌNH TỰ 13

>enzym biến thể B (121 bp-1159 bp, trực tiếp) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGTCCCTCAGTG
 GGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC
 AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
 AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACC GA
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 9 tiếp theo

Số ID TRÌNH TỰ 14

>enzym biến thể C (121 bp-1159 bp, trực tiếp) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCTCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
 ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

Số ID TRÌNH TỰ 15

>enzym biến thể D (46 bp-1084 bp, trực tiếp) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
 ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 9 tiếp theo

Số ID TRÌNH TỰ 16

>enzym biến thể E (46 bp-1084 bp, trực tiếp) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
 ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
 TGCATTGGTATACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

HÌNH 10

Số ID TRÌNH TỰ 17

>enzym biến thể A trưởng thành 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATPEQQGKFTFGSFDQVV
 NFAQQONGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKINNDKAMLTKEIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
 KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVVPVDGIGSQ
 THLDPGQAPQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR*

Số ID TRÌNH TỰ 18

>enzym biến thể B trưởng thành 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATPEQQGKFTFTSFDQVV
 NFAQQONGLYVRGHTLVWHSQLPQWVKINNDKAMLTKEIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
 KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVVPVDGIGSQ
 THLDPGQAPQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR*

Số ID TRÌNH TỰ 19

>enzym biến thể C trưởng thành 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATPEPSQGFNFGSFDQVV
 NFAQQONGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKINNDKATLTKEIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPVDGIGSQ
 THLDPGQAGQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR*

Số ID TRÌNH TỰ 20

>enzym biến thể D trưởng thành 306aa

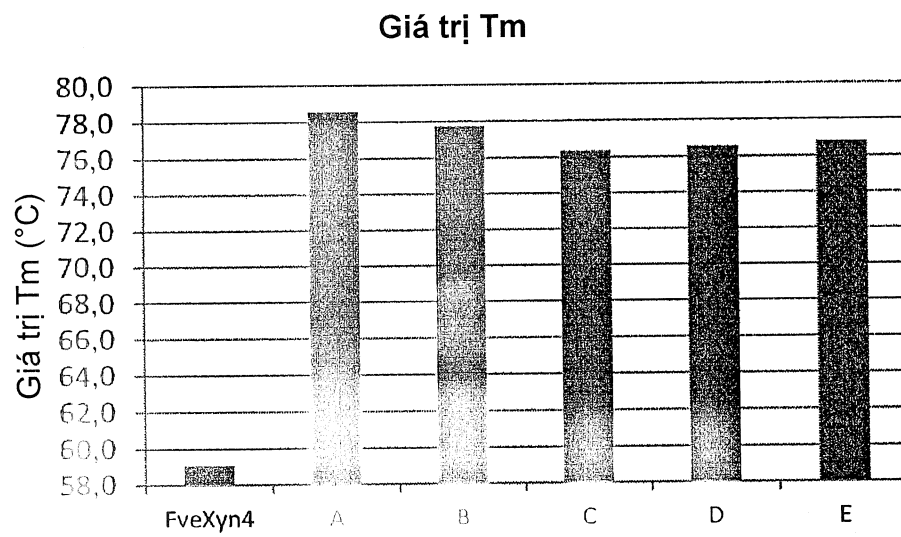
QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATPEQQGKFTFTSFDQVV
 NFAQQONGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKINNDKATLTKEIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPVDGIGSQ
 THLDPGQAGQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR*

Số ID TRÌNH TỰ 21

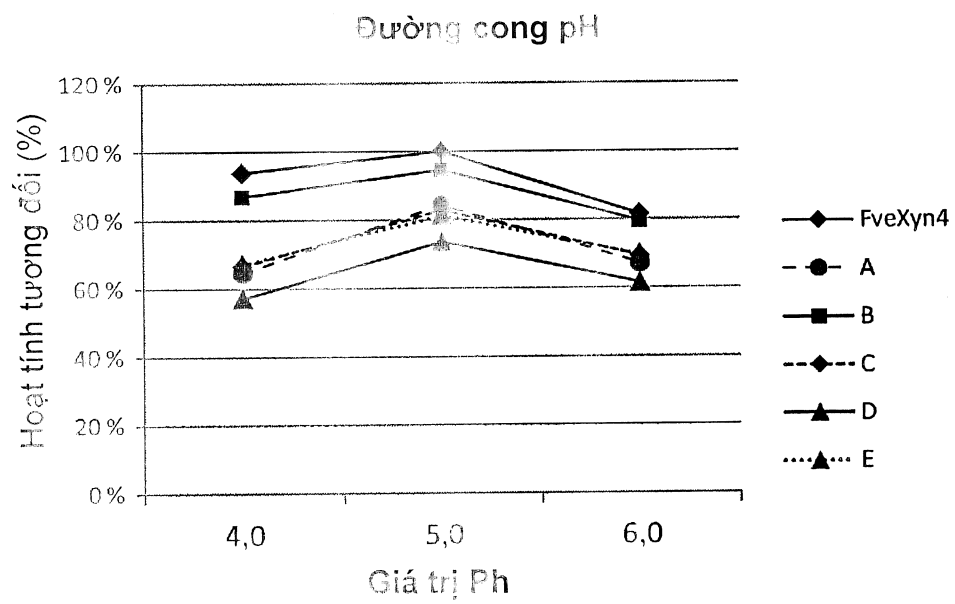
>enzym biến thể E 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATPEPSQGFNFSTFDQVV
 NFAQQONGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKINNDKATLTKEIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPVDGIGSQ
 THLDPGQAGQIQGALTALANSKVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR*

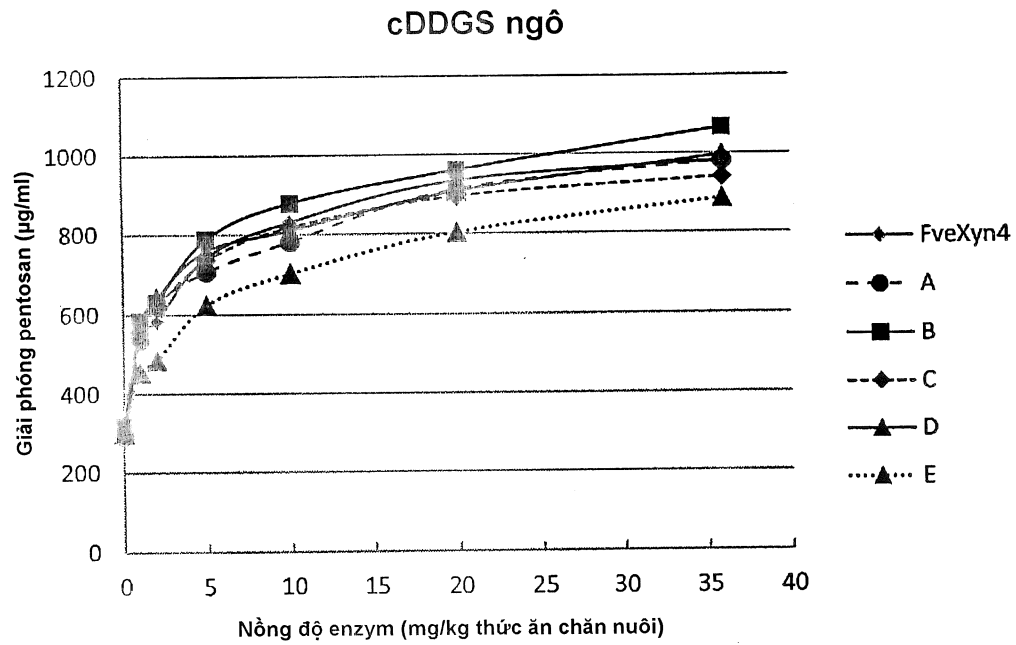
HÌNH 11



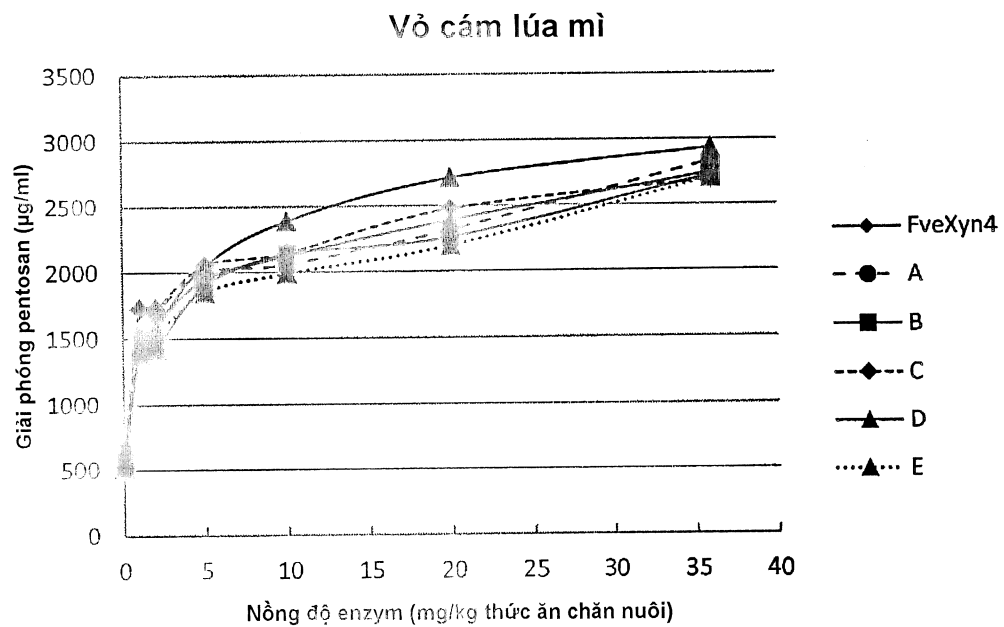
HÌNH 12



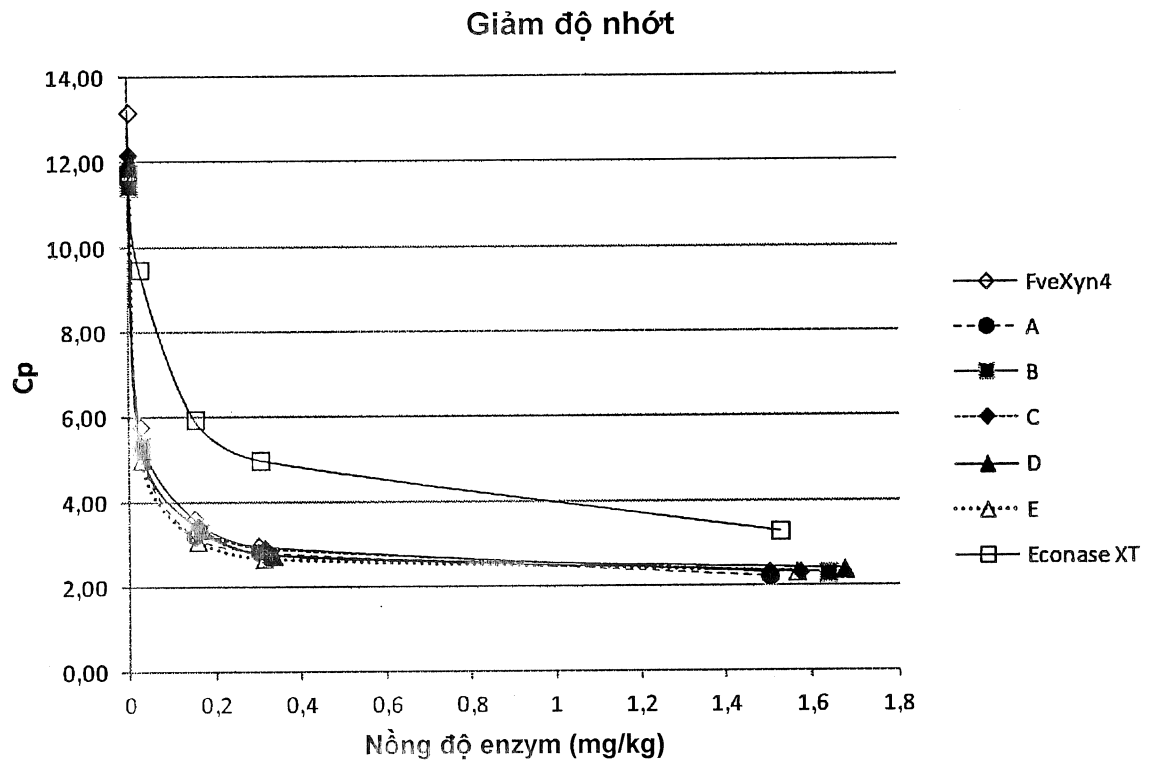
HÌNH 13a



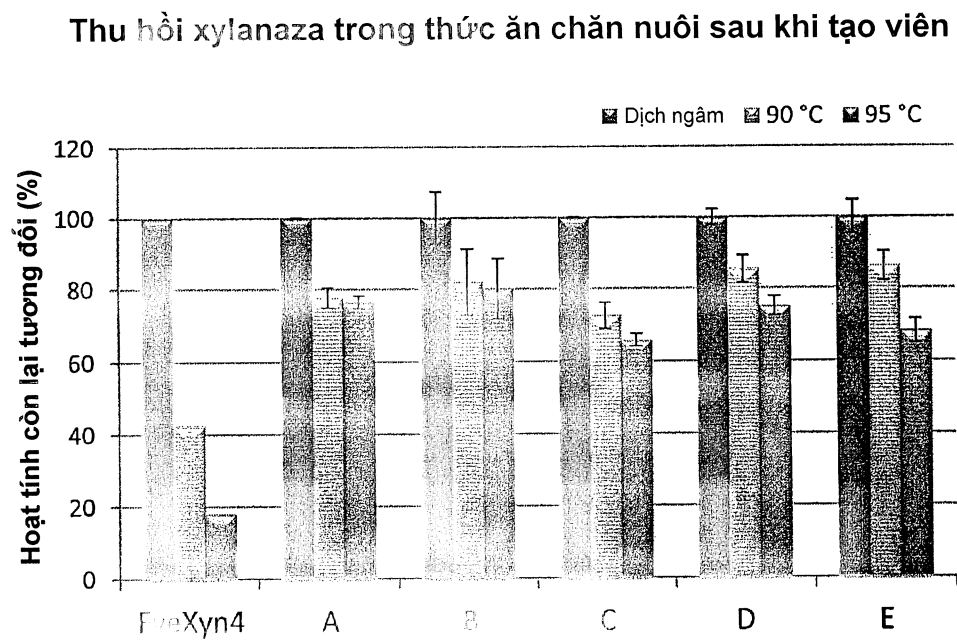
HÌNH 13b



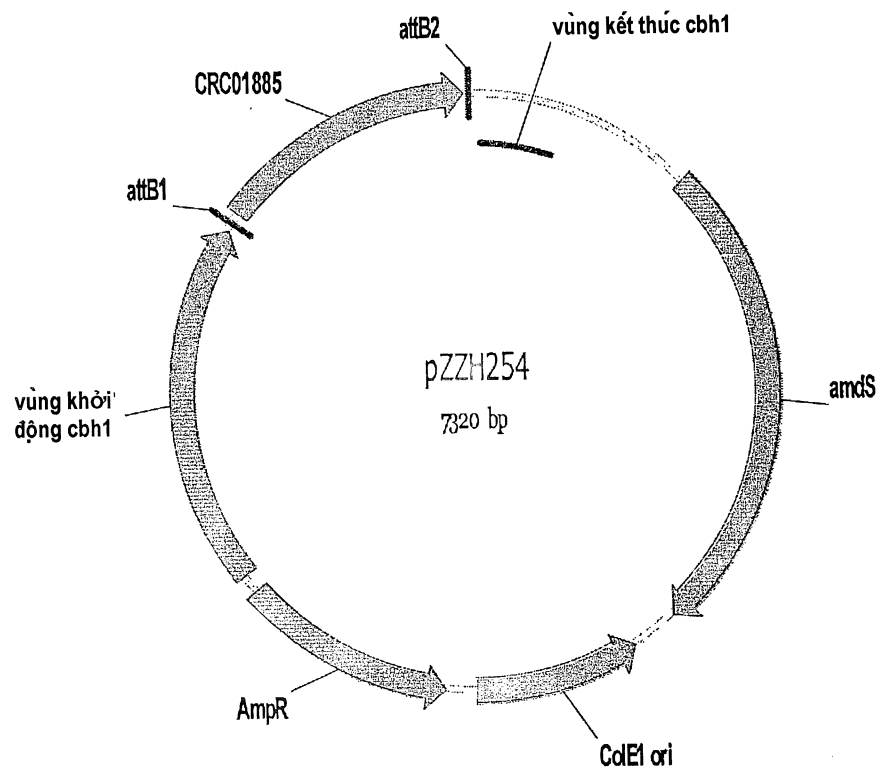
HÌNH 14



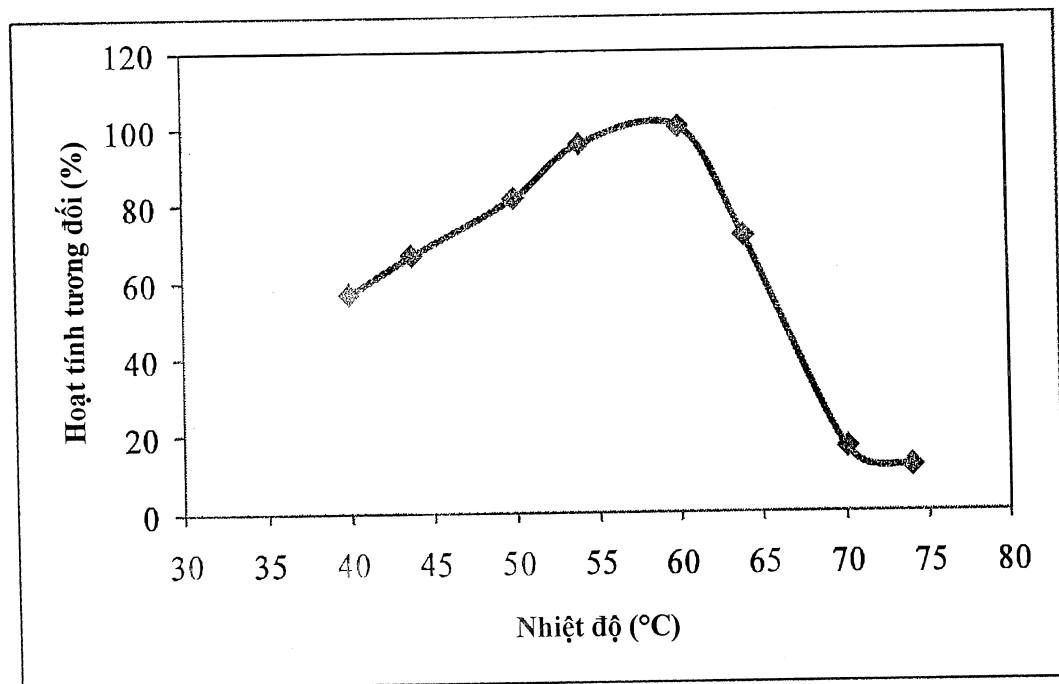
HÌNH 15



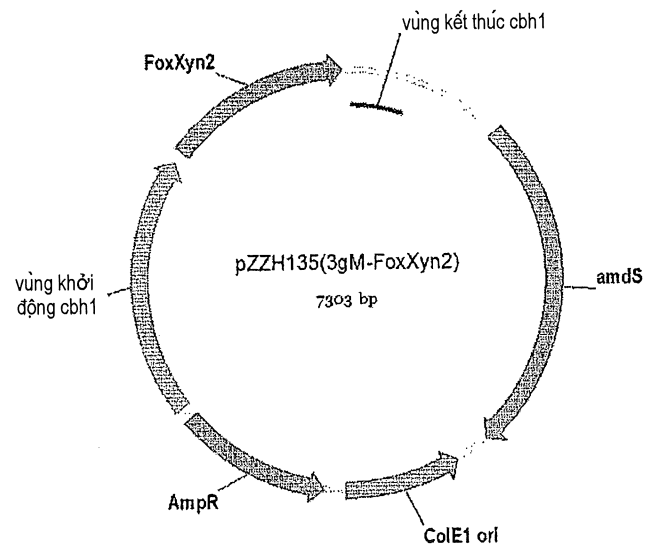
HÌNH 16



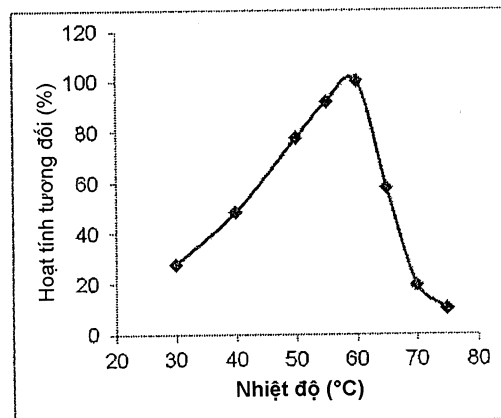
HÌNH 17



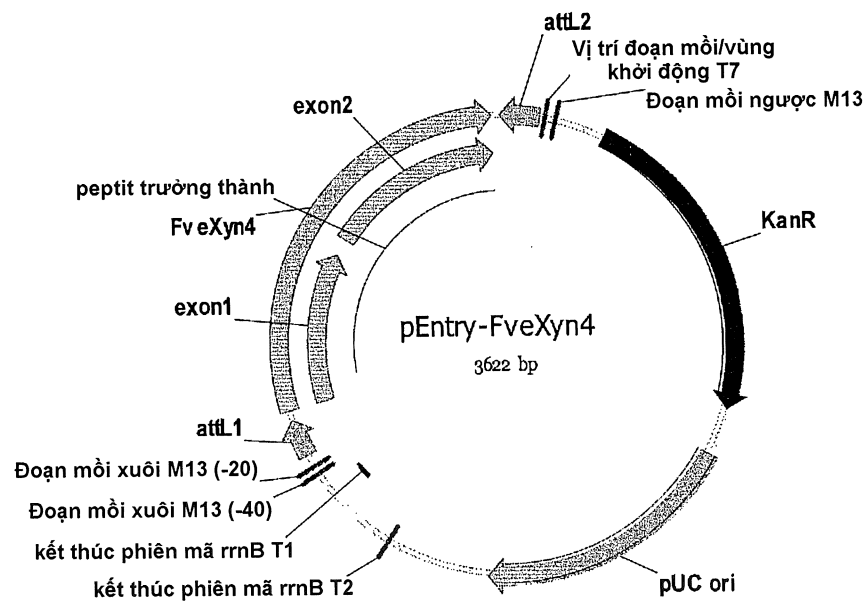
HÌNH 18



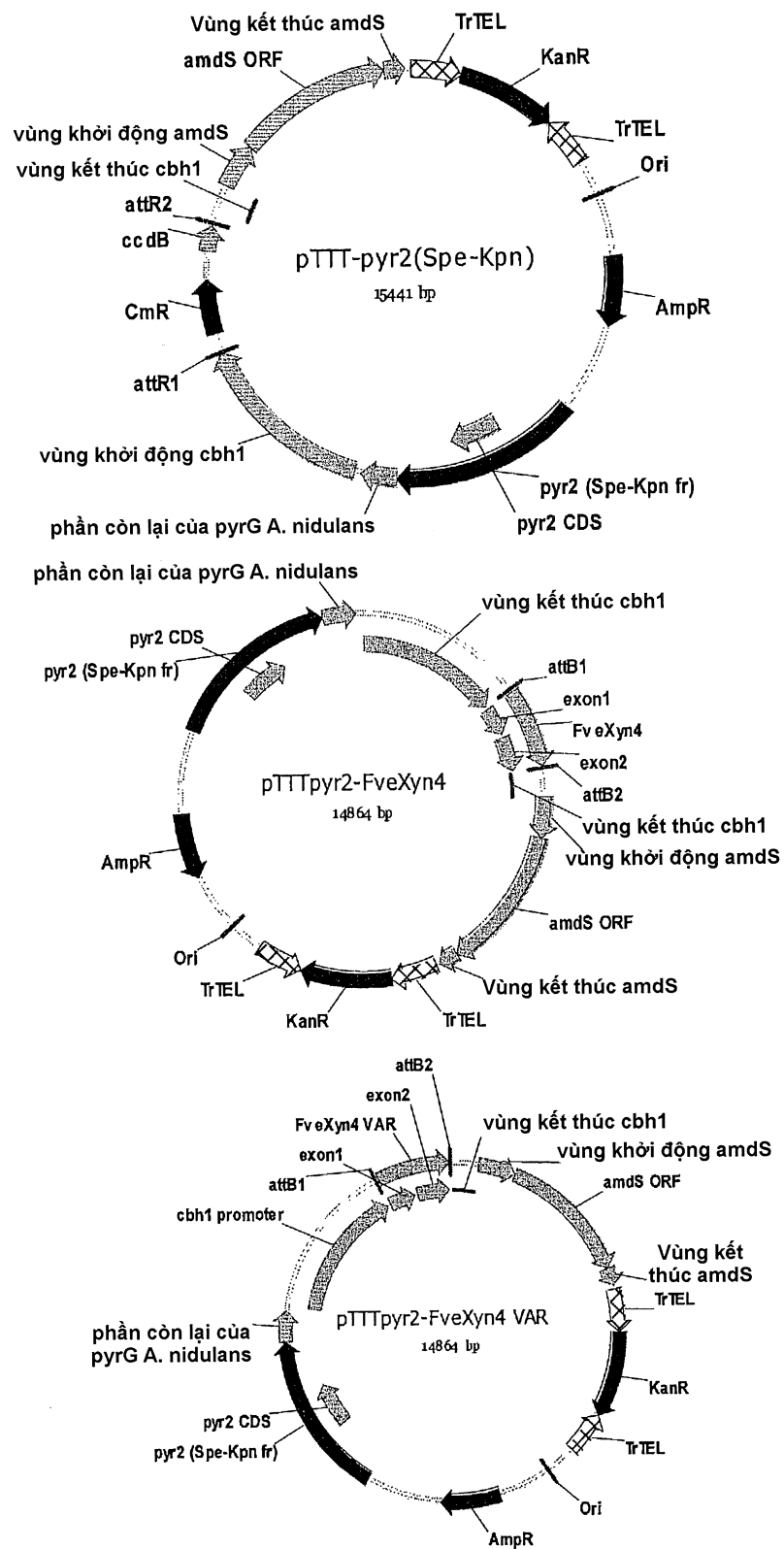
HÌNH 19



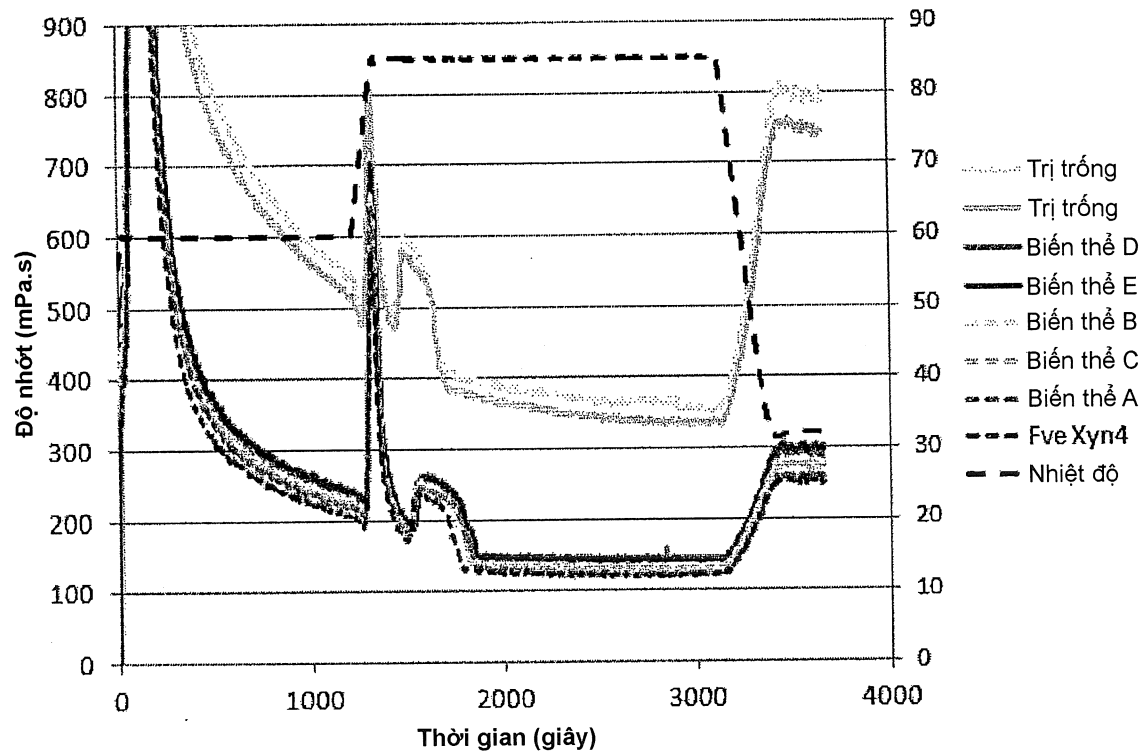
HÌNH 20



HÌNH 21



HÌNH 22



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Dupont Nutrition Biosciences Aps

<120> BIẾN THỂ CỦA ENZYM XYLANAZA GH10, CHẾ PHẨM ENZYM CHỨA BIẾN THỂ NÀY, CHẾ PHẨM PHỤ GIA DÙNG CHO THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ NGUYÊN LIỆU CHỨA TINH BỘT

<130> P046822PCT

<140> PCT/EP2015/051982

<141> 2015-01-30

<150> GB 1401648.9

<151> 2014-01-31

<160> 35

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 305

<212> PRT

<213> *Fusarium verticillioides*

<400> 1

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

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

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
 65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
 100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

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

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
 165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
 180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
 195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 2
 <211> 942
 <212> ADN
 <213> Fusarium verticillioides

<400> 2
 attcccaccg ccatcgagcc ccgccaggct gccgacagca tcaacaagct gatcaagaac

60

aagggcaagc tctactacgg aaccatcacc gaccccaacc tgctcggcgt cgcaaaggac 120
accgccatca tcaaggccga ctttggcgcc gttacccccg agaactcggg caagtgggac 180
gccaccgagc ccagccaggg caagttcaac ttcggtagct tcgaccaggt tgtcaacttt 240
gcccagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctgg tctggcactc tcagctccct 300
cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgtc 360
acccaagtgc ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgtcgt caacgagatc 420
ttcgagtggg acggtaccct ccgaaaggac tctcacttca acaacgtctt cggcaacgac 480
gactacgttg gcattgcctt ccgcgccgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac 540
atcaacgact acagcctcga ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg tatggttccc 600
tccgtcaaga agtggctcag ccagggcggt cccgtcgacg gcattggctc tcagactcac 660
cttgaccccc gtgccgctgg ccaaatccag ggtgctctca ctgccctcgc caattctggt 720
gtcaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcactg cccccgcaa cgactacgct 780
accgtcacca aggctgcct caacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctgggggtgc 840
tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagtcttc tgttcgatgc taactacaac 900
cccaagcctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 3

<211> 305

<212> PRT

<213> *Fusarium oxysporum*

<400> 3

Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
 1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
 20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
 35 40 45

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

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
 65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
 100 105 110

Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

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

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
 165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
 180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
 195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg

305

<210> 4

<211> 942

<212> ADN

<213> Fusarium oxysporum

<400> 4

attcccacccg ccatacgagcc ccgccaggcc tccgacagca tcaacaagct gatcaagaac	60
aagggcaagc tctactacgg aaccatcacc gacccaacc tgctcggcgt cgcaaaggac	120
actgccatca tcaaggctga ctttggcgcc gtcacacccg agaactcggg taagtgggat	180
gccaccgagc ccagccaggg caagttcaac ttcggcagct tcgaccaggt cgtcaacttt	240
gtcagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctag tctggcactc ccagctccct	300
cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actttgacca aggtcatcga gaaccacgtc	360
accaacgtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgtcgt taacgagatc	420
ttcgactggg atggtaccct ccgaaaggac tctcattca acaacgtctt cggcaacgac	480
gactacgttg gcattgcctt ccgcgctgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac	540
atcaacgact acagcctcga ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg catggttccc	600
tctgtcaaga agtggctcag ccagggcgtc cccgtcgacg gtattggttc tcagactcac	660
cttgaccccg gtgccgctgg ccaaattccag ggtgctctca ctgcctcgc caactctggt	720
gtgaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcactg ccccgccaa cgactacgt	780
accgttacca aggctgcct caacgtcccc aagtgcattg gtatcacgt ctggggcgta	840

tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagccttc tggtcgatgc taactacaac 900

cccaaggctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 5

<211> 305

<212> PRT

<213> Fusarium sp.

<400> 5

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Val Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

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

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

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

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
 165 170 175

Ser Leu Asp Ser Ala Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
 180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
 195 200 205

Ser Gln Ser His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Val Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ser Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 6
 <211> 942
 <212> ADN
 <213> Fusarium sp.

<400> 6
 attcccaccg ccacgcagcc ccgccaggcc gccgacagca tcaacaagct gatcaagaac 60
 aagggaagc tctactacgg aaccatcacc gacccaacc tgctcggcgt cgcaaaggac 120
 accgccgtca tcaaggccga ctttggcgcc gtcacccccg agaactcggg caagtgggac 180
 gccaccgagc ccagccaggg caacttcaac ttcggtagct tcgaccaggt cgtcaacttt 240
 gctcagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctgg tctggcactc tcagctccct 300
 cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgctc 360
 acccaagtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgttgt caacgagatc 420
 ttcgactggg acggtaccct ccgaaaggat tctcacttca acaacgtctt cggcaacgat 480

gactacgttg gcattgcctt ccgcgccgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac 540
 atcaacgact acagcctcga ctccgccagc gcctccaagg tcaccaaggg catgggtccc 600
 tccgtcaaga agtgggtcag ccagggcggt ccggtcgacg gcattggctc ccagtctcac 660
 cttgaccccg gtgccgctgg ccaagtccag ggtgctctca ctgccctcgc caactctggt 720
 gtcaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcactg cccccgcaa cgactacgcc 780
 accgtcacca aggcctgcct aaacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctgggggtgtc 840
 tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagccttc tgttcgactc caactacaac 900
 cccaagcctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 7

<211> 987

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 7

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggcgctgcaa aggacgtcgc catcatcaag 180
 gccgactttg gcgccgttac ccccgagAAC tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag 240
 cagggaagt tcaccttcgg tagcttcgac cagggtgtca actttgcca gcagaatggc 300
 ctctacgtcc gaggtcacac tctggtctgg caccgccagc tccctcagtg ggtaagaac 360

atcaacgaca aggctatgct gaccaaggctc attgagaacc acgtcaccca actogttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gtogtcaacg agatcttoga gtgggacggg 480
 accctccgaa aggactctca cttcaaccag gtottcggca acgacgacta cgttggcatt 540
 gccttcgcg cgcgccgcaa ggctgacccc aacgccaaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctcgactccc agagcgccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctacgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgttcccgt cgacggcatt ggctctcaga ctcacctga ccccggtcag 720
 gctccccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctcgccaaatt ctggtgtcaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc 840
 tgccctcaacg tccccaaagt catttggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 8

<211> 987

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 8

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggogtcgcaa aggacgtgc catcatcaag 180

gccgactttg' gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag 240
 cagggcaagt tcaccttcac cagcttcgac caggttgtca actttgcca gcagaatggc 300
 ctctacgtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac 360
 atcaacgaca aggctatgct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca actcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gtctgcaacg agatcttcga gtgggacggt 480
 accctccgaa aggactctca cttcaaccag gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt 540
 gccttcgcg cgcgccgcaa ggtgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctcgactccc agagcgcctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctacgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgttccogt cgacggcatt ggctctcaga ctcaccttga ccccggtcag 720
 gctccccaaa tccaggggtgc tctcactgcc ctcgccaaatt ctggtgtcaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc 840
 tgctcaacg tccccaaagt cattgggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 9

<211> 987

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 9

atgaagctgt cttcttttct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc ccctctgctc ggcgctcgaa aggacgtgc catcatcaag 180
 gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
 cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgccc gcagaatggc 300
 ctctacgtcc gaggtcacac tctggtctgg cacggccagc tccctcagtg ggtaagaac 360
 atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctgggac gtcgtcaacg agatcttcga gtgggacggt 480
 accctcggaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt 540
 gccttcgcg ccgcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctogactccg gcagcgctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgttcccgt cgacggcatt ggctctcaga ctcaccttga ccccggtcag 720
 gctggccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctgcgaatt ctggtgtcaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc 840
 tgctcaacg tccccaaagt cattggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 10
 <211> 987
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 10

atgaagctgt cttcttttct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgctgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag	240
cagggcaagt tcaccttcac cagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctg caccggccagc tccctcagtg ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttggc	420
cgtacaagg gcaagatcta cgctggggac gtcgtcaacg agatcttcga gtgggacggc	480
accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttcgcg ccgcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagcgcctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgttcccg cagcggcatt ggctctcaga ctcaccttga ccccggtcag	720
gctggcctaaa tccagggctg tctcactgcc ctgcgcaatt ctgggtgtcaa ggaggttgcc	780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc	840
tgctcaacg tccccagtg cattgggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac	960

tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa

987

<210> 11

<211> 987

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 11

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaagt tcaacttcac cagcttcgac cagggtgtca actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctgg cacggccagc tccctcagtg ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcggttga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gtcgtcaacg agatcttcga gtgggacggt	480
accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttccgcg ccgccccgaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagcgcctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgttcccg tgcagggcatt ggctctcaga ctcaccttga ccccggtcag	720
gctggccaaa tccaggtgct tctcactgcc ctgcgccaatt ctgggtgtcaa ggaggttgcc	780

atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc 840
 tgcctcaacg tcccccaagt cattggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 12

<211> 1039

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 12

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc cccctgtctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag 180
 gccgaacttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag 240
 cagggcaagt tcaccttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc 300
 ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctgg cacggccagc tccctcagtg ggtaagaac 360
 atcaacgaca aggctatgct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca actcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggta tgttttattc cccagactt cttcgaaatg 480
 actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctccg 540
 aaaggactct cacttcaacc aggtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcg 600

cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660
ccagagcgcc tccaaggtca ccaagggat ggttcctac gtcaagaagt ggctcagcca 720
ggcggttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccggtc aggtcctcca 780
aatccaggtt gctctcactg cctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttg ccatcaccga 840
gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgtacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900
cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa 960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgtgt 1020
tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 13

<211> 1039

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 13

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
gagccccgcc aggtgcccga cagcatcgac aagctgatca agaacaagg caagctctac 120
tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag 180
gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag 240
cagggcaagt tcaccttcac cagcttcgac caggttgtca actttgcca gcagaatggc 300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac 360

atcaacgaca aggctatgct gaccaaggctc attgagaacc acgtcaccca actcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggta tgttttattc cccagactt cttcgaaatg 480
 actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctcgg 540
 aaaggactct cacttcaacc aggtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcgg 600
 cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgcaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660
 ccagagcgcc tccaagggtca ccaagggtat ggttccttac gtcaagaagt ggctcagcca 720
 gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtc aggctcccca 780
 aatccagggg gctctcactg ccctcgcaa ttctgggtgc aaggagggtg ccatcaccga 840
 gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgtacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900
 cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctct gacaagaact cttggcgcaa 960
 ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgtgt 1020
 tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 14

<211> 1039

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 14

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggtgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc ccctctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag 180
 gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
 cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgta actttgcca gcagaatggc 300
 ctctacgtcc gaggtcacac tctggtctgg cacggccagc tccctcagtg ggtaagaac 360
 atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttatto cccagactt ctgcgaatg 480
 actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gactgggacg gtaccctccg 540
 aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg 600
 cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgcaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660
 cggcagcgcc tccaaggta ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca 720
 gggcgttccc gtgcacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtc aggtggcca 780
 aatccagggt gctctcactg ccctcgcaa ttctggtgta aaggagggtg ccatcaccga 840
 gctgcacatc cgactgccc ccgccaacga ctacgtacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900
 cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa 960
 ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgtgt 1020
 tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 15

<211> 1039

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 15

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgcggttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag	240
cagggcaagt tcaccttcac cagcttcgac caggttgtca actttgcccc gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctg caccggccagc tccctcagtg ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttattc cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcgg	600
cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgccaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaagggtca ccaagggtat ggttcctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtc aggctggcca	780
aatccagggt gctctcactg cctcgccaa ttctgggtgc aaggagggtg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgactgccc ccgccaacga ctacgtacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaag tgcatggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgtgt	1020

tgtcaacgct ctccgctaa

1039

<210> 16

<211> 1039

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 16

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggcgtcgcaa aggaogtgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaagt tcaacttcac cagcttcgac caggttgctc actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctctg cacggccagc tccctcagtg ggtaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggctc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgccctgggta tgtttttattc cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagggggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg	600
cgccgccccg aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaaggctc ccaaggggat ggttcctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtc aggctggcca	780

aatccagggg gctctcactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttg ccatcaccga 840
gctcgacatc cgcaactgcc ccgccaacga ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900
cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctct gacaagaact cttggcgcaa 960
ggagcagcac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgctgt 1020
tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 17

<211> 305

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 17

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Gly
50 55 60

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

65

70

75

80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys

85

90

95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Met Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val

100

105

110

Thr Gln Leu Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val

115

120

125

Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His

130

135

140

Phe Asn Gln Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg

145

150

155

160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr

165

170

175

Ser Leu Asp Ser Gln Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro

180

185

190

Tyr Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly

195

200

205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Pro Gln Ile Gln Gly Ala

210

215

220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 18

<211> 305

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 18

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
 1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
 20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
 35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Thr
 50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val
 65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Met Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
 100 105 110

Thr Gln Leu Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

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

Phe Asn Gln Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr

	165		170		175
Ser Leu Asp Ser Gln Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro					
	180		185		190
Tyr Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly					
	195		200		205
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Pro Gln Ile Gln Gly Ala					
	210		215		220
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu					
	225		230		235 240
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys					
		245		250	255
Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val					
	260		265		270
Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp					
	275		280		285
Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu					
	290		295		300
Arg					
305					

<210> 19

<211> 305

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 19

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

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

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val
65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125

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

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
 145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
 165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
 180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
 195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val

, 260

265

270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 20
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 20

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
 1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
 20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
 35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Thr

50		55		60
Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val				
65		70		75 80
Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys				
	85		90	95
Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val				
	100		105	110
Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val				
	115		120	125
Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His				
	130		135	140
Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg				
145		150		155 160
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr				
	165		170	175
Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro				
	180		185	190
Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly				
	195		200	205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
 245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
 260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
 275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu
 290 295 300

Arg
 305

<210> 21

<211> 305

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự xylanase GH10 biến thể

<400> 21

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

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

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val
65 70 75 80

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

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
115 120 125

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

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg

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

Arg

305

<210> 22

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 1

<400> 22

caccatgaag ctgtcttctt tcctcta

27

<210> 23

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 2

<400> 23

tttttagcgg agagcgttga caacagc

27

<210> 24

<211> 1039

<212> ADN

<213> *Fusarium verticillioides*

<400> 24

atgaagctgt cttctttctt ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc

60

gagccccgcc aggctgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac

120

tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccage	240
cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgccc a gcagaatggc	300
ctcaaggtcc gaggtcacac tctgggtctgg cactctcage tccctcagtg ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcggttga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgocctggga tgtttttattc ccccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg	600
cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgccaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaagggtca ccaaggggat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gaccccgggtg ccgctggcca	780
aatccagggt gctctcaactg ccctcgccaa ttctgggtgtc aaggagggtg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgcaactgcc ccgccaacga ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgccccaaag tgcatctgga tcaccgtctg ggggtgtctct gacaagaact cttggcgcaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt aactgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039

<210> 25

<211> 1039

<212> ADN

<213> Fusarium verticillioides

<400> 25

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgccc gcagaatggc	300
ctcaaggctc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcttgggta tgttttattc cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcg	600
cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgccaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaaggcca ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtg ccgctggcca	780
aatccagggt gctctcactg ccctcgccaa ttctggtgtc aaggagggtg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgactgccc ccgccaacga ctacgtacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaag tgcatcggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt aactgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039

<210> 26

<211> 328

<212> PRT

<213> *Fusarium verticillioides*

<400> 26

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

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu
 20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn
 35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly
 50 55 60

Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala
 85 90 95

Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser
 100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly
 130 135 140

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

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

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190

Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly
 210 215 220

Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala
 225 230 235 240

Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn
 260 265 270

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300

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

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 325

<210> 27
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Fusarium verticillioides

<400> 27

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro
 20 25 30

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

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro
 50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe
 65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His
 85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu
 100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys
 115 120 125

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

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp
 145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn
 165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser
 180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln
 195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly

210 215 220
 Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly
 225 230 235 240
 Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala
 245 250 255
 Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys
 260 265 270
 Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys
 275 280 285
 Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala
 290 295 300
 Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 305 310

 <210> 28
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Fusarium oxysporum

 <400> 28

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

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu
 20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn
 35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly
 50 55 60

Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala
 85 90 95

Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser
 100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly
 130 135 140

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

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

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190

Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly
 210 215 220

Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala
 225 230 235 240

Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn
 260 265 270

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300

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

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg

325

<210> 29

<211> 313

<212> PRT

<213> Fusarium oxysporum

<400> 29

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys

1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro

20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe

35 40 45

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro

50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe

65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His

85 90 95

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

100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys
 115 120 125

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

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp
 145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn
 165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser
 180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln
 195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly
 210 215 220

Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly
 225 230 235 240

Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala
 245 250 255

Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys

260 265 270
 Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys
 275 280 285
 Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala
 290 295 300
 Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 305 310

<210> 30

<211> 1039

<212> ADN

<213> Fusarium oxysporum

<400> 30

atgaagctgt cttccttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggctccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacactgc catcatcaag 180
 gctgactttg gcgccgtcac acccgagaac tcgggtaagt gggatgccac cgagcccagc 240
 cagggcaagt tcaacttcgg cagcttcgac caggctgtca actttgctca gcagaatggc 300
 ctcaagggtcc gaggtcacac tctagtctgg cactcccagc tccctcagtg ggttaagaac 360
 atcaacgaca aggctacttt gaccaaggtc atcgagaacc acgtcaccaa cgtcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttcttc actcgaactt cttataaatg 480
 gctttactaa catgttcagg acgtcggtta cgagatcttc gactgggatg gtaccctccg 540

aaagactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg 600
 cgctgcccgc aaggctgacc ccaacgcaa gctgtacatc aacgactaca gctcgactc 660
 cggcagcgcc tccaagggtca ccaagggcat gggtccctct gtcaagaagt ggctcagcca 720
 gggcgcccc gtcgacggta ttggttctca gactcacctt gaccccggtg ccgctggcca 780
 aatccagggt gctctcactg ccctcgcaa ctctgggtgtg aaggagggtg ccatcaccga 840
 gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgtacc gttaccaagg cctgcctcaa 900
 cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg gggcgatatc gacaagaact cttggcgcaa 960
 ggagcaacgac agccttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aaggctgctt aactgctgt 1020
 tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 31

<211> 987

<212> ADN

<213> *Fusarium oxysporum*

<400> 31

atgaagctgt'cttccttct ctacaccgcc tcgctggctg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggcctccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacactgc catcatcaag 180
 gctgactttg, ggcgcgtcac acccgagaac tcgggtaagt gggatgccac cgagcccagc 240
 cagggcaagt tcaacttcgg cagcttcgac caggctgtca actttgctca gcagaatggc 300
 ctcaagggtcc gaggtcacac tctagtctgg cactcccagc tccctcagtg ggtaagaac 360

atcaacgaca aggctacttt gaccaaggtc atcgagaacc acgtcaccaa cgtcggttga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctggggac gtcgttaacg agatcttcga ctgggatgg 480
 accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtottcggca acgaogacta cgttggcatt 540
 gccttcgcg ctgcccgcga ggctgacccc aacgccaaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctcgactccg gcagcgccctc caaggtcacc aagggcattg ttccctctgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgtccccgt cgacgggtatt ggttctcaga ctcaccttga ccccggtgcc 720
 gctggccaaa tccaggggtgc tctcaactgcc ctcgccaaact ctgggtgtgaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt taccaaggcc 840
 tgccccaacg tccccaaagt cattgggtatc accgtctggg gcgtatctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag ctttctgttc gatgctaact acaaccccaa ggctgcttac 960
 actgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 32

<211> 1039

<212> ADN

<213> Fusarium sp.

<400> 32

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggccgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaagg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc cgtcatcaag 180
 gccgactttg gcgccgtcac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
 cagggcaact tcaacttcgg tagcttcgac caggctcgtca actttgctca gcagaatggc 300

ctcaagggtcc gaggtcacac tctggtcttg cactctcagc tccctcagtg ggtaagaac 360
 atcaacgaca aggctactct gaccaagggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttcttg cctcgacctt ctcaaagatg 480
 aatttgctaa catgttcagg acgttgtcaa cgagatcttc gactgggacg gtaccctcgg 540
 aaaggattct cacttcaaca acgtcttcgg caacgatgac tacgttggca ttgccttcgg 600
 cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660
 cgccagcgcc tccaagggtca ccaagggcat ggtcccctcc gtcaagaagt ggctcagcca 720
 gggcgttccc gtcgacggca ttggtccca gtctcacctt gacccgggtg ccgtggcca 780
 agtccagggt gctctcactg ccctcgccaa ctctggtgtc aaggagggtg ccatcaccca 840
 gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgccacc gtcaccaagg cctgcctaaa 900
 cgccccaaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa 960
 ggagcacgac agccttctgt tcgactccaa ctacaacccc aagcctgctt aactgctgt 1020
 tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 33

<211> 987

<212> ADN

<213> Fusarium sp.

<400> 33

atgaagctgt cttttttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggcgcca cagcatcaac aagctgatca agaacaagg caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgctcgcaa aggacaccgc cgtcatcaag 180
 gccgactttg gcgccgtcac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
 cagggcaact tcaacttcgg tagcttcgac caggtcgtca actttgctca gcagaatggc 300
 ctcaaggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac 360
 atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcggttga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgctggggac gttgtcaacg agatcttcga ctgggacggt 480
 accctccgaa aggattctca cttcaacaac gtcttcggca acgatgacta cgttggcatt 540
 gccttcgcgc cgcgccgcaa ggctgacccc aacgccaaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctcgactccg ccagcgctc caaggtcacc aagggcatgg tcccctccgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgttcccgt cgacggcatt ggctcccagt ctcaccttga ccccggtgcc 720
 gctggccaag tccaggggtgc totcaactgcc ctgcgcaact ctgggtgtcaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgccaccgt caccaaggcc 840
 tgccataaac tccccaaagt cattggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcaacgacag ccttctgttc gactccaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 actgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 34

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 1

<400> 34

ccgcggcgcg accatgaagc tgtcttcctt cctctacacc

40

<210> 35

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 2

<400> 35

ccggcgcgcc cttattagcg gagagcgttg acaacag

37