



(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)



1-0052854

(51)⁷ C12N 9/88

(13) B

(21) 1-2019-01729

(22) 12/09/2017

(86) PCT/EP2017/072915 12/09/2017

(87) WO 2018/050649 A1 22/03/2018

(30) 62/395,592 16/09/2016 US

(45) 27/10/2025 451

(43) 26/08/2019 377A

(73) International N&H Denmark ApS (DK)

Parallelvej 16, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark

(72) CRAMER, Jacob Flyvholm (DK); JENSEN, Lene Bojsen (DK).

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

(54) POLYPEPTIT TÁI TỔ HỢP CÓ HOẠT TÍNH AXETOLACTAT
DECARBOXYLAZA (ALDC), CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG
HOẠT TÍNH VÀ/HOẶC ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA POLYPEPTIT NÀY

(21) 1-2019-01729

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp bao gồm các biến thể enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC) có hoạt tính đặc hiệu cao. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm và phương pháp trong đó biến thể ALDC được dùng kết hợp với ion kim loại để làm tăng thêm độ ổn định và/hoặc hoạt tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các biến thể enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC) có hoạt tính đặc hiệu cao, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa các biến thể nêu trên, môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia, và phương pháp sản xuất các sản phẩm rượu bia sử dụng chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Diaxetyl đôi khi là sản phẩm phụ không mong muốn của các quy trình lên men các chất chứa carbonhydrat, ví dụ hèm rượu hoặc nước nho. Sự tạo thành diaxetyl là bất lợi nhất vì nó có mùi mạnh và khó chịu và trong trường hợp sản xuất bia, ngay cả lượng nhỏ của diaxetyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,10 đến 0,15 mg/lít cũng có ảnh hưởng không tốt đến hương và vị của bia. Trong quá trình ủ chín bia, diaxetyl được chuyển hóa thành axetoin bởi reductaza trong các tế bào nấm men. Axetoin chấp nhận được về hương và vị trong bia với nồng độ lớn hơn nhiều so với diaxetyl.

Axetolactat decarboxylaza (ALDC) cũng có thể được sử dụng làm enzym để ngăn ngừa sự tạo thành diaxetyl. α -axetolactat có thể được chuyển hóa thành axetoin bằng cách bổ sung enzym ALDC trong quá trình lên men. Tuy nhiên, ALDC có thể không ổn định ở điều kiện lên men, đặc biệt là điều kiện lên men hèm rượu có hàm lượng mạch nha thấp.

Chế phẩm và phương pháp liên quan đến việc sử dụng axetolactat decarboxylaza đã được báo cáo trong Đơn sáng chế quốc tế số PCT/US16/33028 và PCT/US16/33043. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu xác định các biến thể ALDC có các đặc tính cải thiện, như hoạt tính đặc hiệu cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các biến thể ALDC có hoạt tính đặc hiệu được cải thiện. Các biến thể cải thiện theo sáng chế có thể được kết hợp vào phương pháp, thiết bị, và bộ kit

thích hợp.

Các khía cạnh và phương án của chế phẩm và phương pháp này được nêu trong các đoạn được đánh số riêng rẽ sau đây.

1. Polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) được đề xuất có chứa

(i) ít nhất 80% axit amin đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và trong đó polypeptit có chứa ít nhất một sự thể axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 hoặc

(ii) mảnh chức năng của (i) có hoạt tính đặc hiệu lớn hơn hoặc bằng hoạt tính đặc hiệu của (a).

2. Polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 1 có ít nhất 90% axit amin đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3

3. Polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 2 trong đó sự thể axit amin là T62A.

4. Polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 3 có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8.

5. Chế phẩm có chứa polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 1, đoạn 2, đoạn 3 hoặc đoạn 4 và kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM.

6. Chế phẩm theo đoạn 5, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 μ M đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μ M đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 50 μ M, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

7. Chế phẩm theo đoạn 5 trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với polypeptit tái tổ hợp là

(i) lớn hơn 1; hoặc

(ii) 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc

(iii) 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc

(iv) 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc

(v) 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc

(vi) 60:1 hoặc lớn hơn.

8. Chế phẩm theo đoạn 5, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza được xử lý bằng glutaraldehyt.

9. Chế phẩm theo đoạn 8, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza được xử lý bằng glutaraldehyt là ở nồng độ tương ứng với khoảng từ khoảng 0,1 gam đến khoảng 5 gam glutaraldehyt mỗi gam polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza.
10. Chế phẩm theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn nêu trên, trong đó hoạt tính của polypeptit tái tổ hợp này có hoạt tính axetolactat decarboxylaza nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.
11. Chế phẩm theo đoạn bất kỳ nêu trên còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.
12. Chế phẩm theo đoạn bất kỳ nêu trên, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza có nguồn gốc từ axetolactat decarboxylaza từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.
13. Sử dụng chế phẩm theo bất kỳ trong số các đoạn nêu trên trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê.
14. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 1 hoặc đoạn 2 trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào chế phẩm chứa polypeptit tái tổ hợp sao cho kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM.
15. Phương pháp theo đoạn 14, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 5 mM.
16. Môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ tái tổ hợp có khả năng sản xuất polypeptit tái tổ hợp theo đoạn 1, đoạn 2, đoạn 3 hoặc đoạn 4 có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM.
17. Môi trường nuôi cấy theo đoạn 16, có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM .
18. Môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê có chứa chế phẩm có chứa

- a) polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) theo đoạn 1, đoạn 2, đoạn 3 hoặc đoạn 4, và;
- b) kẽm; trong đó chế phẩm này có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μ M đến khoảng 200 mM.

19. Môi trường lên men của môi trường ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê theo đoạn 18, trong đó polypeptit tái tổ hợp này có hoạt tính axetolactat decarboxylaza nằm trong khoảng từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

20. Môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê theo đoạn 19, còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixelulaza, xelulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

21. Phương pháp để sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm việc bổ sung chế phẩm có chứa polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) theo đoạn 1, đoạn 2, đoạn 3 hoặc đoạn 4 và kẽm vào môi trường thích hợp để sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê.

22. Phương pháp theo đoạn 21 trong đó

- (i) kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM; hoặc
- (ii) tỷ lệ mol của kẽm so với polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza trong chế phẩm cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc điểm và ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết sau đây, phần mô tả chi tiết này đưa ra các phương án minh họa, trong đó các nguyên lý của sáng chế được sử dụng, và các hình vẽ kèm theo:

Fig.1 thể hiện bản đồ plasmit của pSVH1.

Fig.2 thể hiện bản đồ plasmit của pSVH1_Bbrev_aldB để biểu hiện axetolactat decarboxylaza, aldB.

Fig.3 thể hiện SDS-PAGE với các biến thể của aldB được biểu hiện ở chủng *Bacillus subtilis*. Làn: 1 và 26) phân tử khối được đánh dấu, Làn 2-7) BSA chuẩn, Làn 8-9) aldB được tinh chế, Làn 10-16) aldB-T62A, Làn 17-19) aldB-T62A w. 50% glyxerol, Làn 19-22) aldB và Làn 23-25 aldB w. 50% glyxerol. Các tiêu chuẩn và biến thể aldB được đánh dấu bằng đường màu hồng.

Mô tả vắn tắt các trình tự sinh học

Các trình tự sau đây tuân theo 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825 (“Yêu Cầu Đối Với Đơn Sáng Chế Chứa Sự Bộc Lộ Trình Tự Nucleotit và/hoặc Trình Tự Axit Amin- Quy Tắc Trình Tự” (Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules) và thống nhất với Tiêu chuẩn của tổ chức sở hữu trí tuệ thế giới (World Intellectual Property Organization - WIPO) ST.25 (2009) và các yêu cầu về danh mục trình tự của Công ước sáng chế châu Âu (European Patent Convention - EPC) và Hiệp ước hợp tác sáng chế (Patent Cooperation Treaty - PCT) Điều 5.2 và Điều 49.5(a-bis), và Phần 208 và Phụ lục C của Chỉ thị hành chính. Ký hiệu và định dạng được sử dụng đối với dữ liệu trình tự nucleotit và axit amin tuân theo quy tắc nêu trong 37 C.F.R. § 1.822.

SEQ ID NO: 1 là trình tự polynucleotit mã hóa gen *aldB* kiểu đại từ *Brevibacillus brevis*.

SEQ ID NO: 2 là trình tự polypeptit của protein tiền chất aldB kiểu đại từ *Brevibacillus brevis*.

SEQ ID NO: 3 là trình tự polypeptit của protein aldB trưởng thành kiểu đại từ *Brevibacillus brevis*.

SEQ ID NO: 4 là trình tự polynucleotit của gen *aldB* trong plasmid pSVH1_Bbrev_aldB.

SEQ ID NO: 5 là trình tự polypeptit của protein tiền chất aldB được mã hóa bởi gen *aldB* trong plasmid pSVH1_Bbrev_aldB.

SEQ ID NO: 6 là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể aldB-T62A.

SEQ ID NO: 7 là trình tự polypeptit của tiền chất của tiền chất biến thể aldB-T62A.

SEQ ID NO: 8 là trình tự polypeptit của protein aldB-T62A trưởng thành.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp, chế phẩm, thiết bị và bộ kit có chứa các biến thể axetolactat decarboxylaza có hoạt tính đặc hiệu cải thiện khi so với enzym bố mẹ mà chúng có nguồn gốc từ đó.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp, thiết bị, chế phẩm và bộ kit để sử dụng ion kim loại để làm tăng độ ổn định và/hoặc hoạt tính, và, tùy ý, còn có thể được sử dụng để thu hồi các enzym biến thể ALDC với các đặc tính được cải thiện.

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như được hiểu thông thường bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), và Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cuốn từ điển chung về nhiều thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "có chứa" nghĩa là sự có mặt của các đặc điểm, các số nguyên, các bước, hoặc các thành phần được chỉ ra như được đề cập đến trong yêu cầu bảo hộ, nhưng nó không loại trừ sự có mặt hoặc sự bổ sung của một hoặc nhiều đặc điểm, số nguyên, bước, thành phần hoặc nhóm khác của chúng. Thuật ngữ "có chứa" được dự định là bao gồm các phương án được bao hàm bởi các thuật ngữ "về cơ bản gồm có" và "gồm có". Tương tự, thuật ngữ "về cơ bản gồm có" được dự định là bao gồm các phương án được bao hàm bởi thuật ngữ "gồm có".

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" biến đổi số lượng của thành phần hoặc chất phản ứng theo sáng chế hoặc được dùng để chỉ sự biến thiên về số lượng số mà có thể xảy ra, ví dụ, thông qua các quy trình xử lý chất lỏng và đo lường thông thường được sử dụng để tạo ra các dịch đặc hoặc sử dụng các dung dịch trong thế giới thực; thông qua lỗi vô ý trong các quy trình này; thông qua sự khác biệt trong sản xuất, nguồn, hoặc độ tinh khiết của các thành phần được sử dụng để tạo ra các chế phẩm hoặc thực hiện các phương pháp; và tương tự. Thuật ngữ "khoảng" cũng bao gồm số lượng khác nhau do các điều kiện cân bằng khác nhau đối với chế phẩm thu được từ một hỗn hợp ban đầu cụ thể. Cho dù có sửa đổi bởi thuật ngữ "khoảng" hay không, các yêu cầu bảo hộ bao gồm các đương lượng với số lượng.

Khi có mặt, tất cả các khoảng giá trị bao gồm toàn bộ và có thể kết hợp. Ví dụ, khi khoảng giá trị "từ 1 đến 5" được chỉ ra, khoảng giá trị được chỉ ra này cần được hiểu là bao gồm các khoảng giá trị "từ 1 đến 4", "từ 1 đến 3", "từ 1 đến 2", "từ 1 đến 2 và từ 4 đến 5", "từ 1 đến 3 và 5", và dạng tương tự.

Trừ khi được quy định khác đi, trình tự axit nucleic bất kỳ được viết từ trái sang phải theo hướng từ 5' đến 3'; trình tự axit amin được viết từ trái sang phải theo hướng amino đến carboxy, một cách tương ứng.

Cần phải lưu ý rằng như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm, các dạng số ít "một" bao gồm cả tham chiếu số nhiều trừ khi được nêu khác đi. Do đó, ví dụ, viện dẫn đến "proteaza" bao gồm nhiều enzym như vậy và viện dẫn đến "thức ăn" bao gồm viện dẫn đến một hoặc nhiều thức ăn và các dạng tương đương của nó đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và vân vân.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất xúc tác enzym" đề cập đến chất xúc tác có chứa enzym có hoạt tính ALDC và có thể ở dạng tế bào sinh vật toàn phần, (các) tế bào vi sinh vật thậm, một hoặc nhiều thành phần tế bào của chiết xuất tế bào vi sinh vật, enzym tinh khiết một phần hoặc enzym tinh khiết. Chất xúc tác enzym cũng có thể được biến đổi hóa học (ví dụ, bằng cách pegyl hóa hoặc bằng phản ứng với chất phản ứng liên kết chéo, chẳng hạn như glutaraldehyd). Chất xúc tác enzym có thể còn cũng được cố định nhờ hỗ trợ hòa tan hoặc không hòa tan sử dụng các phương pháp đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực; tham khảo ví dụ, Immobilization of Enzymes and Cells; Gordon F. Bickerstaff, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, Mỹ; 1997.

Thuật ngữ "axit amin" dùng để chỉ đơn vị cấu trúc hóa học cơ bản của protein hoặc polypeptit. Các chữ viết tắt sau đây được sử dụng ở đây để xác định các axit amin cụ thể:

	Chữ viết tắt <u>ba chữ cái</u>	Chữ viết tắt <u>một chữ cái</u>
<u>Axit Amin</u>		
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Axit aspartic	Asp	D
Xystein	Cys	C

Glutamin	Gln	Q
Axit glutamic	Glu	E
Glyxin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuxin	Ile	I
Leuxin	Leu	l
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Axit amin bất kỳ hoặc như xác định	Xaa	X

trong bản mô tả này

Như được sử dụng ở đây, “cơ bản tương tự” để chỉ phân tử axit nucleic trong đó sự thay đổi ở một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn đến việc bổ sung, thế, hoặc làm khuyết một hoặc nhiều axit amin, nhưng không làm ảnh hưởng đến đặc điểm chức năng (tức là, hoạt tính ALDC) của protein được mã hóa bởi trình tự ADN. Như được sử dụng ở đây, “cơ bản tương tự” còn đề cập đến enzym có trình tự axit amin mà ít nhất 40%, tốt hơn là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 80%, vẫn còn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 95% đồng nhất với trình tự được báo cáo trong bản mô tả này trong đó enzym tạo thành duy trì các đặc điểm chức năng theo sáng chế (tức là, hoạt tính ALDC). “Cơ bản tương tự” có thể còn đề cập đến enzym có hoạt tính ALDC được mã hóa bởi phân tử axit nucleic mà lại dưới các điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic được báo cáo ở đây. Do đó cần hiểu rằng sáng chế bao hàm nhiều hơn các trình tự ví dụ cụ thể.

Ví dụ như, đã biết rõ trong lĩnh vực rằng các thay đổi trong gen mà dẫn đến sự sản xuất của axit amin tương đương về mặt hóa học ở vị trí nhất định, nhưng không ảnh hưởng đến đặc điểm chức năng của protein được mã hóa là phổ biến. Nhằm các mục

đích của sáng chế, sự thể được xác định là trao đổi ở trong một trong năm nhóm sau đây:

1. Gốc không phân cực hoặc phân cực nhẹ, béo nhỏ: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Gốc tích điện âm, phân cực và amit của chúng: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Gốc tích điện dương, phân cực: His, Arg, Lys;
- Gốc không phân cực, béo lớn: Met, Leu, Ile, Val (Cys); và
5. Các gốc thơm lớn: Phe, Tyr, và Trp.

Do đó, bộ ba mã hóa cho axit amin alanin, axit amin kỵ nước, có thể được thể bằng bộ ba mã hóa mã hóa cho gốc khác ít kỵ nước hơn (chẳng hạn như glyxin) hoặc gốc khác kỵ nước nhiều hơn (chẳng hạn như valin, leuxin, hoặc isoleuxin). Tương tự, sự thay đổi mà dẫn đến sự thể của một gốc tích điện âm cho gốc tích điện âm khác (chẳng hạn như axit aspartic đối với axit glutamic) hoặc một gốc tích điện dương cho gốc tích điện dương khác (chẳng hạn như lysin đối với arginin) cũng có thể được mong đợi để sản xuất ra sản phẩm tương đương về mặt chức năng. Trong nhiều trường hợp, sự thay đổi nucleotit mà dẫn đến sự thay đổi của các phần ở đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của phân tử protein cũng sẽ không được mong đợi là làm thay đổi hoạt tính của protein.

Mỗi sự cải biến được đề xuất thường nằm trong hiểu biết thông thường trong lĩnh vực, như là xác định sự giữ lại hoạt tính sinh học của sản phẩm được mã hóa. Hơn nữa, chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng các trình tự cơ bản tương tự được bao hàm theo sáng chế. Theo một phương án, trình tự cơ bản tương tự được xác định bởi khả năng lai của nó, dưới các điều kiện nghiêm ngặt (0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C và được rửa bằng 2X SSC, 0,1% SDS sau đó bằng 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C) bằng các trình tự được lấy ví dụ trong bản mô tả này.

Như được sử dụng ở đây, phân tử axit nucleic “có thể lai được” với phân tử axit nucleic khác, như cADN, ADN bộ gen, hoặc ARN, khi chuỗi đơn của phân tử thứ nhất có thể ủ với phân tử kia dưới các điều kiện thích hợp về nhiệt độ và cường độ ion của dung dịch. Điều kiện lai và rửa là đã biết và được minh họa trong Sambrook, J. and Russell, D., T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tái bản lần thứ ba, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001). Các điều kiện về nhiệt độ và cường độ ion quyết định “mức độ nghiêm ngặt” của sự lai. Các điều kiện nghiêm ngặt có thể được điều chỉnh để sàng lọc các phân tử tương tự vừa phải, như các trình tự tương đồng từ các sinh vật có liên quan xa, đến các phân tử tương tự cao, như các gen

nhân đôi các enzyme chức năng từ các sinh vật có liên quan gần. Rửa sau lai thường xác định các điều kiện nghiêm ngặt. Một tập hợp các điều kiện ưu tiên sử dụng một loạt các lần rửa bắt đầu với 6X SSC, 0,5% SDS ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, sau đó lặp lại với 2X SSC, 0,5% SDS ở 45 ° C trong 30 phút, và sau đó lặp lại hai lần với 0,2X SSC, 0,5% SDS ở 50 ° C trong 30 phút. Một tập hợp các điều kiện được ưu tiên hơn sử dụng nhiệt độ cao hơn trong đó các lần rửa giống với các điều kiện bên trên ngoại trừ nhiệt độ của hai lần rửa 30 phút cuối trong 0,2X SSC, 0,5% SDS được tăng lên 60 ° C. Một tập hợp các điều kiện lai nghiêm ngặt được ưu tiên khác là 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65 ° C và được rửa bằng 2X SSC, 0,1% SDS sau đó lần rửa cuối là 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65 ° C với các trình tự được nêu trong tài liệu này.

Việc lai đòi hỏi hai axit nucleic chứa các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của việc lai, có thể có sự không phù hợp giữa các bazơ. Mức độ nghiêm ngặt thích hợp để lai các axit nucleic phụ thuộc vào độ dài của axit nucleic và mức độ bổ sung, các biến đã biết trong lĩnh vực. Mức độ tương đồng hoặc tương tự giữa hai trình tự nucleotit càng lớn, giá trị của T_m đối với các thể lai của axit nucleic có các trình tự đó càng lớn. Độ ổn định tương đối (tương ứng với T_m cao hơn) của việc lai axit nucleic giảm theo thứ tự sau: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Đối với các thể lai dài hơn 100 nucleotit, các phương trình để tính T_m đã được rút ra (Sambrook and Russell, *trên đây*). Để lai với các axit nucleic ngắn hơn, tức là, oligonucleotit, vị trí bất cặp lỗi trở nên quan trọng hơn, và độ dài của oligonucleotit xác định tính đặc hiệu của nó (Sambrook and Russell, *trên đây*). Theo một khía cạnh, độ dài đối với axit nucleic lai được là ít nhất khoảng 10 nucleotit. Tốt hơn là, độ dài tối thiểu đối với axit nucleic lai được là ít nhất khoảng 15 nucleotit theo chiều dài, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 20 nucleotit theo chiều dài, còn tốt hơn nữa là ít nhất 30 nucleotit theo chiều dài, còn tốt hơn nữa là ít nhất 300 nucleotit theo chiều dài, và tốt nhất là ít nhất 800 nucleotit theo chiều dài. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực còn hiểu rằng nhiệt độ và nồng độ muối của dung dịch rửa có thể được điều chỉnh khi cần theo các nhân tố như độ dài của mẫu dò.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phần trăm tương đồng" là mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, được xác định bằng cách so sánh các trình tự. Trong lĩnh vực này, "độ tương đồng" cũng có nghĩa là mức độ liên quan trình tự giữa các trình tự polypeptit hoặc các trình tự polynucleotit,

tùy theo từng trường hợp có thể, như được xác định bằng cách làm phù hợp giữa các sợi của các trình tự này. "Độ tương đồng" và "độ tương tự" có thể được tính dễ dàng bằng các phương pháp đã biết, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); và Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, NY (1991). Các phương pháp xác định độ tương đồng và độ tương tự được mã hóa trong các chương trình máy tính sẵn có công khai. Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự và các phép tính phần trăm tương đồng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Megalign của bộ chương trình tin sinh LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI), chương trình AlignX của hãng Vector NTI v. 7.0 (Informax, Inc., Bethesda, MD), hoặc Hệ Phần Mềm Mở EMBOSS (EMBL-EBI; Rice *et al.*, *Trends in Genetics* 16, (6):276-277 (2000)). Sự sắp xếp thẳng hàng đa trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp Clustal (chẳng hạn như CLUSTALW; ví dụ phiên bản 1.83) về sắp xếp thẳng hàng (Higgins and Sharp, *CABIOS*, 5:151-153 (1989); Higgins *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994); và Chenna *et al.*, *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-500 (2003)), có sẵn ở Phòng Thí Nghiệm Sinh Học Phân Tử Châu Âu thuộc Viện Tin Sinh Học Châu Âu) với các tham số mặc định. Các tham số thích hợp để sắp xếp thẳng hàng protein CLUSTALW bao gồm điểm phạt Tồn Tại CHỖ CÁCH QUẢNG =15, Sự kéo dài CHỖ CÁCH QUẢNG =0,2, ma trận = Gonnet (ví dụ, Gonnet250), CHỖ CÁCH QUẢNG KẾT THÚC protein = -1, KHOẢNG CÁCH CHỖ CÁCH QUẢNG protein=4, và KTUPLE=1. Theo một phương án, sắp xếp thẳng hàng nhanh hoặc chậm được thực hiện với các thiết lập mặc định mà tại đó sắp xếp thẳng hàng chậm được ưu tiên. Theo cách khác, các tham số sử dụng phương pháp CLUSTALW (phiên bản 1.83) có thể được cải biến để cũng sử dụng KTUPLE =1, ĐIỂM PHẠT CHỖ CÁCH QUẢNG=10, Sự kéo dài CHỖ CÁCH QUẢNG =1, ma trận = BLOSUM (ví dụ BLOSUM64), WINDOW=5, và TOP DIAGONALS SAVED=5.

Theo một khía cạnh, phân tử axit nucleic được phân lập thích hợp (polynucleotit được phân lập theo sáng chế) mã hóa polypeptit có trình tự axit amin mà có ít nhất

khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với trình tự axit amin được báo cáo ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “sự thoái hóa bộ ba mã hóa” đề cập đến bản chất của biến thể cho phép mã hóa gen của trình tự nucleotit mà không ảnh hưởng đến trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa. Theo đó, sáng chế liên quan đến phân tử axit nucleic bất kỳ mà mã hóa toàn bộ hoặc phần cơ bản của trình tự axit amin mã hóa polypeptit theo sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rõ “xu hướng bộ ba mã hóa” thể hiện bởi tế bào chủ đặc hiệu trong sử dụng bộ ba mã hóa nucleotit để đặc hiệu axit amin được cho. Do đó, khi tổng hợp gen để biểu hiện cải thiện trong tế bào chủ, mong muốn thiết kế gen sao cho tần suất sử dụng bộ ba mã hóa của nó đạt tần suất của việc sử dụng được ưu tiên bộ ba mã hóa của tế bào chủ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bộ ba mã hóa được tối ưu hóa” như để chỉ gen hoặc vùng mã hóa của phân tử axit nucleic để biến nạp nhiều vật chủ khác nhau, dùng để chỉ sự biến đổi của các bộ ba mã hóa trong gen hoặc vùng mã hóa của các phân tử axit nucleic để phản ánh việc sử dụng bộ ba mã hóa tiêu biểu của sinh vật chủ mà không làm thay đổi polypeptit mà ADN mã hóa cho.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết hoạt động” dùng để chỉ sự kết hợp của các trình tự axit nucleic trên một phân tử axit nucleic đơn lẻ sao cho chức năng của axit nucleic này bị ảnh hưởng bởi axit nucleic kia. Ví dụ, vùng khởi động được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa khi nó có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa đó, tức là, trình tự mã hóa chịu sự kiểm soát phiên mã của vùng khởi động. Các trình tự mã hóa có thể được liên kết hoạt động với các trình tự điều hòa theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biểu hiện” đề cập đến sự phiên mã và tích tụ ổn định ARN có nghĩa (mARN) hoặc đối nghĩa có nguồn gốc từ phân tử axit nucleic theo sáng chế. Sự biểu hiện cũng có thể dùng để chỉ sự dịch mã mARN thành polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, “sự biến nạp” dùng để chỉ sự đưa phân tử axit nucleic vào trong hệ gen của sinh vật chủ dẫn đến sự thừa hưởng ổn định về mặt di truyền. Theo sáng chế, bộ gen của tế bào chủ bao gồm gen nhiễm sắc thể và ngoài nhiễm sắc thể (ví dụ plasmid). Sinh vật chủ chứa các phân tử axit nucleic được biến nạp được gọi là sinh vật “chuyển gen” hoặc “tái tổ hợp” hoặc được biến nạp”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phần mềm phân tích trình tự” đề cập đến thuật toán máy tính hoặc chương trình phần mềm bất kỳ hữu dụng để phân tích trình tự nucleotit hoặc axit amin. “Phần mềm phân tích trình tự” có thể có bán trên thị trường hoặc được phát triển độc lập. Phần mềm phân tích trình tự thông thường sẽ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bộ chương trình GCG (phiên bản gói Wisconsin 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), và DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 USA), CLUSTALW (ví dụ, phiên bản 1.83; Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-4680 (1994), và chương trình FASTA kết hợp với thuật toán Smith-Waterman (W. R. Pearson, *Comput. Methods Genome Res.*, [Proc. Int. Symp.] (1994), Ngày họp 1992, 111-20. (Các) Chủ biên: Suhai, Sandor. Nhà xuất bản: Plenum, New York, NY), Vector NTI (Informax, Bethesda, MD) và Sequencher v. 4.05. Trong ngữ cảnh sáng chế, người ta sẽ hiểu rằng khi phần mềm phân tích trình tự được sử dụng để phân tích, kết quả phân tích sẽ dựa trên “các giá trị mặc định” của chương trình được viện dẫn, trừ khi có quy định khác. Như được sử dụng ở đây “các giá trị mặc định” sẽ có nghĩa là bất kỳ bộ giá trị hoặc tham số nào được thiết lập bởi nhà sản xuất phần mềm mà tải về ban đầu với phần mềm khi khởi tạo lần đầu.

Tất cả các sáng chế và công bố đơn sáng chế Mỹ được viện dẫn ở đây đều được kết hợp bằng cách viện dẫn toàn bộ trừ khi có quy định khác.

Axetolactat decarboxylaza (ALDC)

Axetolactat decarboxylaza (ALDC) là enzym thuộc họ carboxy lyaza, chịu trách nhiệm phân cắt liên kết cacbon-cacbon. Axetolactat decarboxylaza xúc tác sự biến đổi 2-axetolactat (còn được biết là 2-hydroxy-2-metyl-3-oxobutanoat) thành 2-axetoin và giải phóng CO₂. Các thuật ngữ “(các) axetolactat decarboxylaza”, “(các) ALDC”, “(các) enzym ALDC”, “(các) enzym có hoạt tính axetolactat decarboxylazat, (các) polypeptit có hoạt tính axetolactat decarboxylaza” có thể được sử dụng hoán đổi nhau trong bản mô tả này.

Enzym axetolactat decarboxylaza xúc tác phản ứng enzym thuộc phân loại EC 4.1.1.5 (hoạt tính axetolactat decarboxylaza) và ID từ khóa của Bản đồ ngữ nghĩa gen (GO) là GO: 0047605. ID từ khóa GO chỉ rõ rằng protein bất kỳ, được đặc trưng là có từ khóa GO có liên quan này, mã hóa enzym với hoạt tính axetolactat decarboxylaza xúc tác.

Các gen axetolactat decarboxylaza khác nhau (như *alsD* hoặc *aldB*), mã hóa enzym axetolactat decarboxylaza, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Gen *alsD*, mã hóa polypeptit tái tổ hợp, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus subtilis*. Gen *aldB*, mã hóa polypeptit tái tổ hợp, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus brevis*. Gen *alsD*, mã hóa polypeptit tái tổ hợp, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus licheniformis*. Số truy cập UNIPROT Q65E52.1 là ví dụ về polypeptit tái tổ hợp. Số truy cập UNIPROT Q65E52.1 là ví dụ về polypeptit tái tổ hợp thu được hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus licheniformis*. Các ví dụ của gen axetolactat decarboxylaza bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gen được đề xuất bởi trình tự theo mã truy cập GENBANK® số YP_005006068.1, AEV96664.1, ACL05881.1, YP_002484831.1, YP_002433349.1, YP_002323676.1, YP_001959767.1, YP_001950964.1, YP_001814731.1, YP_001643659.1, YP_001530174.1, YP_001479659.1, YP_001317786.1, YP_001317390.1, YP_001176753.1, YP_663316.1, ACL46470.1, ACJ53298.1, ACD94444.1, ABW68097.1, ABV42531.1, ABP60702.1, ABR53499.1, ABR53103.1, ABY42031.1, ABG42262.1, ACE04286.1, ACB61714.1, ZP_03624564.1, ZP_03073518.1, EEF65194.1, EDX43464.1, YP_005422842.1, YP_005132076.1, YP_004758694.1, YP_004605085.1, YP_001247975.1, YP_001247593.1, YP_001270742.1, CCG51526.1, CCF06881.1, AEK35621.1, AE108921.1, ABQ82405.1, ABQ50399.1, ABQ50017.1, ZP_10276647.1, ZP_09451796.1, ZP_08659936.1, ZP_08575126.1, và Mã truy cập UNIPROT số P23616.1 (Diderichsen *et al.*, *J Bacteriol.* (1990) 172(8): 4315) và P23616.1.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “(các) biến thể ALDC”, “ALDC biến thể”, “enzym ALDC biến thể”, “enzym biến thể ALDC” “(các) polypeptit có hoạt tính axetolactat decarboxylaza được cải thiện”, “(các) biến thể polypeptit có hoạt tính ALDC”, “(các) polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza”, và “polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính ALDC” sẽ chỉ các enzym axetolactat decarboxylaza biến thể như được mô tả ở đây có tính chất cải thiện (ví dụ, hoạt tính đặc hiệu tăng) so với enzym ALDC mà chúng có nguồn gốc từ đó (nghĩa là dạng trưởng thành của ALDC *Brevibacillus brevis* có trình tự axit amin được đề xuất là SEQ ID NO: 3) khi được thử nghiệm dưới cùng điều kiện phản ứng. Theo một khía cạnh, biến thể ALDC có chứ ít nhất một sự thay thế axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của trình tự được thể hiện trong

SEQ ID NO: 3 (dạng trưởng thành). Như được sử dụng ở đây, câu “theo đánh số vị trí” có nghĩa là vị trí gốc axit amin 62 sử dụng việc đánh số gốc của ID SEQ NO: 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất enzym ALDC có hoạt tính cụ thể được cải thiện và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của enzym ALDC biến thể mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính đặc hiệu cải thiện” hoặc “hoạt tính đặc hiệu tăng” đề cập đến (các) enzym axetolactat decarboxylaza biến thể có hoạt tính đặc hiệu axetolactat decarboxylaza tăng khi so với hoạt tính ALDC của enzym mà biến thể có nguồn gốc từ đó (tức là, ALDC *Brevibacillus brevis* có trình tự axit amin được đề xuất là SEQ ID NO: 3) dưới cùng điều kiện phản ứng. Cần hiểu rằng số vị trí là so với dạng trưởng thành của protein mà biến thể có nguồn gốc từ đó (SEQ ID NO: 3) và việc đánh số vị trí tương đối có thể dịch chuyển khi đề cập đến protein tiền chất (ví dụ, SEQ ID NO: 2 đối với *Brevibacillus brevis* ALDC).

Theo một phương án, số lần tăng về hoạt tính đặc hiệu của axetolactat decarboxylaza đối với các biến thể theo sáng chế là ít nhất 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10, 11, 12, hoặc 13 lần khi so với hoạt tính của trình tự kiểu đại dưới các điều kiện cơ bản tương tự.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "vi sinh vật chủ", "chủng" và "vi sinh vật" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

Cần phải hiểu rằng enzym ALDC thích hợp bất kỳ, tức là ALDC được sản xuất từ vi sinh vật bất kỳ, hoạt tính của nó tùy thuộc vào ion kim loại, có thể được sử dụng. Theo một số phương án, ALDC được sử dụng trong phương pháp và chế phẩm theo sáng chế là biến thể ALDC có nguồn gốc từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

Hoạt tính ALDC của chế phẩm enzym được đo bởi thử nghiệm ALDC như được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Thử nghiệm chuẩn được tiến hành ở độ pH 6,0, và nó có thể được thực hiện ở các giá trị độ pH và nhiệt độ khác nhau để mô tả đặc điểm và đặc tính bổ sung của enzym.

Một đơn vị hoạt tính ALDC được định nghĩa là lượng enzym sản xuất 1 μmol axetoin cho mỗi phút trong các điều kiện của thử nghiệm (ví dụ, pH 6,0 (hoặc như được chỉ rõ) và nhiệt độ 30 °C).

Theo một số phương án, ALDC biến thể là dẫn xuất ALDC biến thể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dẫn xuất ALDC biến thể” đề cập đến (các) biến thể ALDC

theo sáng chế mà đã trải qua sự dẫn xuất hóa học bằng cách sử dụng hợp chất phản ứng, như glutaraldehyt. Theo một số phương án, dẫn xuất ALDC biến thể được đặc trưng ở chỗ ALDC biến thể trong môi trường chứa nước được xử lý hoặc đã được xử lý bằng glutaraldehyt. Theo một số phương án, ALDC biến thể được xử lý hoặc đã được xử lý bằng glutaraldehyt với nồng độ tương ứng với từ 0,1 đến 5 gam glutaraldehyt cho mỗi gam protein ALDC biến thể (tinh khiết), tốt hơn là tương ứng với từ 0,25 đến 2 g glutaraldehyt cho mỗi gam protein ALDC biến thể (tinh khiết).

Theo một số phương án, enzym ALDC biến thể có chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO: 3 (protein trưởng thành), trong đó polypeptit còn có chứa ít nhất một sự thể axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của SEQ ID NO: 3 (protein trưởng thành) hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó miễn là có sự thể axit amin ở vị trí 62. Theo một phương án, sự thể là T62A. Theo phương án được ưu tiên, ALDC biến thể có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 (protein trưởng thành).

Theo một số phương án, enzym có giá trị tối ưu nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5-80 °C, như nằm trong khoảng từ 5-40 °C hoặc 15-80°C, như trong khoảng 20-80 °C, như trong khoảng 5-15 °C, 10-40 °C, 10-50 °C, 15-20 °C, 45-65 °C, 50-65 °C, 55-65 °C hoặc 60-80 °C. Theo một số phương án, enzym này có giá trị tối ưu nhiệt độ khoảng 60 °C.

Theo một số phương án, enzym có tổng số axit amin ít hơn 350, như ít hơn 340, như ít hơn 330, như ít hơn 320, như ít hơn 310, như ít hơn 300 axit amin, như nằm trong khoảng từ 200 đến 350, như nằm trong khoảng từ 220 đến 345 axit amin. Theo một phương án, enzym biến thể (dạng trưởng thành) có chứa khoảng 261 axit amin.

Theo một phương án, trình tự axit amin của enzym biến thể còn có chứa (ngoài sự thể theo sáng chế ở vị trí 62) ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười sự thể axit amin bổ sung so với SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, chế phẩm, môi trường và phương pháp có chứa bất kỳ một hoặc nhiều (các) enzym khác. Theo một số phương án, một hoặc nhiều (các) enzym khác này được chọn từ danh sách gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixelulaza, xelulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan,

xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, xylan axetyl esteraza), proteaza, và kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm, môi trường và phương pháp có chứa enzym thể hiện hoạt tính axetolactat decarboxylaza, trong đó hoạt tính của enzym này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, chế phẩm, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, chế phẩm, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC là enzyme có chứa trình tự axit amin có ít nhất 80% đồng nhất với SEQ ID NO: 3, trong đó polypeptit còn có chứa ít nhất một sự thể axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của SEQ ID NO: 3 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm ALDC biến thể trong đó sự thể axit amin là T62A. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm ALDC biến thể có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 (protein trưởng thành).

Di truyền protein

Dự định là nucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm gen có hoạt tính tăng cường hoặc thay đổi hơn nữa. Các phương pháp khác nhau là đã biết để làm đột biến trình tự gen bẩm sinh để tạo ra sản phẩm gen có hoạt tính thay đổi hoặc tăng cường bao gồm, nhưng không giới hạn ở 1) đột biến ngẫu nhiên, 2) hoán đổi miền (sử dụng miền ngón tay kẽm hoặc enzym tới hạn, 3) PCR dễ bị lỗi (Melnikov *et al.*, *Nucleic Acids Research* 27(4):1056-1062 (1999)); 4) đột biến hướng điểm (Coombs *et al.*, *Proteins* (1998), pp 259-311, 1 plate. Angeletti, Ruth Hogue, Ed., Academic: San Diego, Calif.); và 5) “xáo trộn gen” (Sáng chế Mỹ số 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; và 5,837,458, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) có thể được sử dụng để khuếch đại mảnh ADN với sự tạo ra đồng thời của nhiều đột biến bằng cách kết hợp sai nucleotit. Điều này có thể đạt được bằng cách biến đổi các điều kiện PCR như thay đổi tỷ lệ dNTP hoặc bổ sung lượng mangan clorua khác nhau trong phản ứng (Fromant *et al.*, *Anal*

Biochem, 224(1):347-53 (1995); Lin-Goerke *et al.*, *Biotechniques*, 23(3):409-12 (1997)). Nhóm các mảnh ADN bị đột biến sau đó có thể được tách dòng để tạo ra ngân hàng các plasmit bị đột biến mà sau đó có thể được sàng lọc theo biểu hiện trong một vật chủ như *E. coli*.

Phương pháp xáo trộn gen đặc biệt hấp dẫn do thực hiện dễ dàng, và tỷ lệ đột biến cao và dễ sàng lọc. Quá trình xáo trộn gen liên quan đến sự phân cắt endonucleaza tới hạn của gen có lợi thành các mảnh có kích thước cụ thể với sự có mặt của các quần thể bổ sung của các vùng ADN có sự tương đồng và/hoặc khác biệt với gen có lợi. Nhóm các mảnh này sau đó sẽ được biến tính và tái tạo để tạo ra gen đột biến. Các gen đột biến sau đó được sàng lọc về hoạt tính biến đổi.

Các trình tự ví dụ theo sáng tính có thể bị đột biến và sàng lọc về hoạt tính biến đổi hoặc tăng cường bằng phương pháp này. Các trình tự có thể là chuỗi đôi và có thể có độ dài khác nhau từ 50 bp đến 10 kB. Các trình tự có thể được tiêu hóa ngẫu nhiên thành các mảnh nằm trong khoảng từ khoảng 10 bp đến 1000 bp, sử dụng endonucleaza tới hạn đã biết trong lĩnh vực (Sambrook, J. and Russell, *trên đây*). Ngoài các trình tự vi sinh vật ví dụ, quần thể của các mảnh có thể lai với tất cả hoặc một phần của trình tự có thể được thêm vào. Tương tự, quần thể các mảnh, mà không thể lai với trình tự ví dụ, cũng có thể được thêm vào. Các quần thể mảnh bổ sung thường được thêm vào trong phần dw từ khoảng 10 đến 20 lần theo khối lượng so với tổng số axit nucleic. Thông thường, nếu quá trình này được tuân thủ, số lượng các mảnh axit nucleic đặc hiệu khác nhau trong hỗn hợp sẽ là khoảng 100 đến 1000. Quần thể hỗn hợp của các mảnh axit nucleic ngẫu nhiên được biến tính để tạo thành các mảnh axit nucleic chuỗi đơn và sau đó được ủ lại. Chỉ những mảnh axit nucleic chuỗi đơn có vùng đồng nhất với các mảnh axit nucleic chuỗi đơn khác mới được ủ lại. Các mảnh axit nucleic ngẫu nhiên có thể bị biến tính bằng các gia nhiệt. Chuyên gia trong lĩnh vực có thể xác định các điều kiện cần thiết để làm biến tính hoàn toàn axit nucleic chuỗi đôi. Tốt hơn là nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 80 °C đến 100 °C. Các mảnh axit nucleic có thể được ủ lại bằng cách làm nguội. Tốt hơn là nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 20 °C đến 75 °C. Tái tạo có thể được tăng tốc bằng cách bổ sung polyetylen glycol ("PEG") hoặc muối. Nồng độ muối thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0 mM đến 200 mM. Các mảnh axit nucleic được ủ sau đó được ủ với sự có mặt của polymeraza axit nucleic và dNTP (tức là, dATP, dCTP, dGTP và dTTP). Các polymeraza axit nucleic có thể là mảnh

Klenow, polymeraza Taq hoặc polymeraza ADN bất kỳ khác được biết đến trong lĩnh vực. Các polymeraza có thể được thêm vào các mảnh axit nucleic ngẫu nhiên trước khi ủ, đồng thời với ủ hoặc sau khi ủ. Chu trình biến tính, tái tạo và ủ với sự có mặt của polymeraza được lặp lại với số lần mong muốn. Tốt hơn là chu kỳ được lặp lại từ 2 đến 50 lần, tốt hơn nữa là trình tự được lặp lại từ 10 đến 40 lần. Axit nucleic thu được là một polynucleotit sợi đôi lớn hơn, nằm trong khoảng từ khoảng 50 bp đến đến khoảng 100 kB và có thể được sàng lọc về biểu hiện và hoạt tính biến đổi bởi các giao thức tách dòng và biểu hiện tiêu chuẩn (Sambrook, J. and Russell, *trên đây*).

Hơn nữa, protein lai có thể được lắp ráp bằng cách dung hợp các vùng chức năng bằng cách xáo trộn gen (*ví dụ*, Nixon *et al.*, *PNAS*, 94:1069-1073 (1997)). Vùng chức năng của gen ví dụ có thể được kết hợp với vùng chức năng của các gen khác để tạo ra các enzyme mới với chức năng xúc tác mong muốn. Enzyme lai có thể được cấu trúc bằng các phương pháp mở rộng chồng chéo PCR và được tách dòng thành các vector biểu hiện khác nhau bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Ion kim loại

Theo một khía cạnh, phương pháp và chế phẩm có chứa các enzyme ALDC biến thể được đề xuất có hoạt tính đặc hiệu tốt hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm có chứa enzyme ALDC biến thể mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật với hiệu suất được cải thiện.

Việc xử lý chế phẩm ALDC biến thể bằng một số ion kim loại nhất định ở các nồng độ nhất định tạo ra enzyme ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của hoạt tính ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 255 pm. Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 165 pm. Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 150 pm. Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 142 pm đến khoảng 146 pm.

Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án,

ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Thuật ngữ "kẽm" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể thay thế lẫn nhau với thuật ngữ " Zn^{2+} ". Thuật ngữ "kim loại" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "ion kim loại". Thuật ngữ "kim loại" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ hợp chất có chứa kim loại được chọn từ nhóm bao gồm kẽm, magie, mangan, coban, đồng, bari, canxi và sắt; hợp chất có chứa các kim loại này là nguồn ion tương ứng. Thuật ngữ "kẽm" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hợp chất có chứa kẽm, các hợp chất này là nguồn ion Zn^{2+} . Kẽm sulfat (ZnSO_4) là ví dụ về kẽm như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Zn^{2+} . Magie sulfat (MgSO_4) là ví dụ về magie như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Mg^{2+} . Mangan(II) sulfat (MnSO_4) là ví dụ về mangan như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Mn^{2+} . Coban(II)clorua (CoCl_2) là ví dụ về coban như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Co^{2+} . Đồng(II) sulphat (CuSO_4) là ví dụ về đồng như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Cu^{2+} . Bari sulfat (BaSO_4) là ví dụ về bari như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Ba^{2+} . Canxi sulfat (CaSO_4) là ví dụ về canxi như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Ca^{2+} . Sắt(II) sulfat (FeSO_4) là ví dụ về sắt như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Fe^{2+} .

Ion kim loại như Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} làm tăng độ ổn định của (các) enzym ALDC biến thể trong các chế phẩm khác nhau (xem phần các Ví dụ), và cũng cải thiện hiệu suất thu hồi từ vi sinh vật khi ion kim loại được sử dụng trong quá trình sản xuất enzym trong môi trường nuôi cấy. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm làm tăng hiệu suất thu hồi, độ ổn định và/hoặc hoạt tính của enzym ALDC mà sau đó có thể được sử dụng, ví dụ, để sản xuất sản phẩm lên men như trong quá trình ủ.

Theo một số phương án, enzym ALDC có hoạt tính cụ thể ít nhất khoảng 900 đơn vị cho mỗi mg protein (U/mg), ít nhất khoảng 1000 U/mg, ít nhất khoảng 1500 U/mg, ít nhất khoảng 2000 U/mg, ít nhất khoảng 3000 U/mg ít nhất khoảng 5000 U/mg, ít nhất khoảng 6000 U/mg, ít nhất khoảng 7000 U/mg, ít nhất khoảng 8000 U/mg, ít nhất khoảng 8500 U/mg, ít nhất khoảng 9000 U/mg, ít nhất khoảng 9500 U/mg, hoặc ít nhất khoảng 10000 U/mg như được xác định bởi các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Theo một số phương

án, enzym ALDC biến thể có hoạt tính ALDC nằm trong khoảng từ khoảng 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein (U/mg), từ khoảng 1000 đến 3500 U/mg, hoặc từ khoảng 1500 đến 3500 U/mg như được xác định bởi các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể theo sáng chế với hoạt tính ALDC bằng ít nhất khoảng 900 đơn vị cho mỗi gam sản phẩm, ít nhất khoảng 1000 U/g, ít nhất khoảng 1500 U/g, ít nhất khoảng 2000 U/g, ít nhất khoảng 3000 U/g ít nhất khoảng 5000 U/g, như ít nhất khoảng 6000 U/g, như ít nhất khoảng 7000 U/g, như ít nhất khoảng 8000 U/g, như ít nhất khoảng 8500 U/g, như ít nhất khoảng 9000 U/g, như ít nhất khoảng 9500 U/g, như ít nhất khoảng 10000 U/g như được xác định trong các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Theo một số phương án, hoạt tính ALDC khác được sử dụng, ví dụ, tùy thuộc vào các yêu cầu về điều kiện và hàm lượng axetolactat, ví dụ cho quá trình ủ. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể với hoạt tính ALDC bằng ít nhất khoảng 8000 U/g.

Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 100 μM , hoặc khoảng 15 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM

đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} .

Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và kẽm trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 100 μM , hoặc khoảng 15 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm

trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 3 mM, hoặc từ khoảng 0,75 mM đến khoảng 4mM, hoặc từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 0,25 mM đến khoảng 7,5 mM, hoặc từ khoảng 0,1 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, hoạt tính của ALDC biến thể này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp theo sáng chế có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc 100:1, hoặc 150:1, hoặc 200:1, hoặc 250:1, hoặc 500:1. Theo một số phương án, chế phẩm có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 2:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 5:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 10:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 20:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 30:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc phương pháp có chứa ALDC biến thể và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 60:1 hoặc lớn hơn. Nồng độ mol của, ví dụ, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} hoặc ion kim loại khác trong dung dịch có thể được xác định bằng phép đo quang phổ phát xạ nguyên tử plasma ghép cặp cảm ứng (ICP-OES) hoặc các kỹ thuật tương tự. Nồng độ mol của ALDC biến thể có thể được xác định bằng cách sử dụng hệ SDS-PAGE tiêu chuẩn (như được mô tả trong các ví dụ) và trình tự axit amin.

Theo một số phương án, ALDC biến thể là dẫn xuất ALDC biến thể. Theo một

số phương án, dẫn xuất ALDC biến thể là enzym ALDC biến thể được xử lý bằng glutaraldehyt. Theo một số phương án, enzym ALDC biến thể được xử lý bằng glutaraldehyt ở nồng độ tương ứng với từ khoảng 0,1 đến khoảng 5 g glutaraldehyt cho mỗi gam ALDC biến thể (tốt hơn là tinh khiết).

Theo một số phương án, chế phẩm enzym ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men và/hoặc ủ chín của quy trình điều chế đồ uống, ví dụ, bia và rượu vang, để làm giảm mức diacetyl. Các thuật ngữ "chế phẩm enzym ALDC biến thể", "chế phẩm có chứa ALDC biến thể" và "chế phẩm có chứa ALDC biến thể" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ chế phẩm có chứa có chứa (enzym) ALDC biến thể (hoặc kết hợp của (các enzym) ALDC biến thể. Chế phẩm này có thể ở dạng dung dịch. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chế phẩm enzym ALDC biến thể" và "chế phẩm có chứa các biến thể ALDC" loại trừ lẫn nhau với môi trường (như môi trường nuôi cấy, môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín) có chứa vi sinh vật biểu hiện biến thể ALDC và/hoặc có khả năng biểu hiện biến thể ALDC khi được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện enzym này. Ví dụ về chế phẩm ALDC biến thể và chế phẩm có chứa (các) biến thể ALDC bao gồm chế phẩm có chứa biến thể ALDC ở dạng được tinh chế. Biến thể ALDC có thể được tinh chế từ môi trường có chứa vi sinh vật có khả năng biểu hiện biến thể ALDC trong đó môi trường này được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện biến thể ALDC. Thuật ngữ "được tinh chế" nghĩa là biến thể ALDC có mặt ở mức cao. Tốt hơn là, biến thể ALDC là thành phần chủ yếu có mặt trong chế phẩm. Tốt hơn là, ALDC có mặt ở mức ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% hoặc ít nhất khoảng 98%, mức này được xác định trên cơ sở khối lượng khô/khối lượng khô so với tổng chế phẩm đang xem xét. Theo một số phương án, chế phẩm (enzym) biến thể ALDC còn có chứa ion kim loại như kẽm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "đồ uống" và "sản phẩm đồ uống" bao gồm đồ uống lên men tạo bọt như bia được ủ với 100% mạch nha, bia được ủ trong nhiều kiểu thiết đặt khác nhau, rượu bia, bia "khô", bia rất ít cồn, bia nhẹ, bia có hàm lượng cồn thấp, bia thấp calo, rượu bia đen, bia đen Đức, bia đen, nặng, rượu mạch nha, bia không cồn, rượu mạch nha không cồn và các loại tương tự. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm bia không bọt và đồ uống mạch nha thay thế như đồ uống mạch nha có hương vị trái cây, ví dụ, hương vị cam chanh,

như đồ uống mạch nha hương vị chanh vàng, cam, chanh cốm, hoặc quả mọng, đồ uống mạch nha hương vị rượu, ví dụ, rượu mạch nha hương vị rượu vốt-ca, rượu rum, hoặc rượu têquila, hoặc đồ uống mạch nha hương vị cà phê, như rượu mạch nha hương vị cà phê-in, và các loại tương tự. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm bia được làm từ nguyên liệu thay thế khác với lúa mạch tạo mạch nha, như lúa mạch đen, ngũ cốc, yến mạch, gạo, kê, lúa mì đen, sắn, lúa miến, lúa mạch, lúa mì và hỗn hợp của chúng. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm các sản phẩm lên men khác như rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê.

Bia theo truyền thống được gọi là đồ uống có cồn có nguồn gốc từ mạch nha, như mạch nha có nguồn gốc từ hạt lúa mạch, và tùy ý thành phần phụ thêm, như nguyên liệu thực vật chứa tinh bột (ví dụ hạt ngũ cốc) và tùy ý được tạo hương vị, ví dụ với hoa bia. Thuật ngữ "bia" bao gồm hèm rượu lên men bất kỳ, được sản xuất bằng cách lên men/ủ nguyên liệu thực vật chứa tinh bột, do đó cụ thể cũng bao gồm bia được sản xuất riêng từ thành phần phụ thêm, hoặc hỗn hợp bất kỳ của mạch nha và thành phần phụ thêm. Bia có thể được làm từ nhiều nguyên liệu thực vật chứa tinh bột khác nhau bởi quy trình về cơ bản giống nhau, trong đó tinh bột chủ yếu gồm homopolyme glucoza trong đó các gốc glucoza được liên kết bởi liên kết alpha-1, 4 hoặc alpha-1,6, trong đó liên kết alpha-1, 4 chiếm ưu thế. Bia có thể được làm từ nguyên liệu thay thế như lúa mạch đen, ngô, yến mạch, gạo, kê, lúa mì đen, sắn, lúa miến, lúa mì, lúa mạch và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) có chứa ALDC biến thể và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 100 mM, như khoảng 0,1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 200 μM , hoặc khoảng 50 μM đến khoảng 1 mM,

hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 120 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM hoặc khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM hoặc khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của biến thể ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, môi trường lên men (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở

nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 100 mM, như khoảng 0,1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 200 μM , hoặc khoảng 50 μM đến khoảng 1 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 120 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê) có chứa biến thể ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của biến thể ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 3500 đơn vị cho

mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, môi trường ủ chín (ví dụ ủ chín bia và/hoặc rượu vang) còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, ion kim loại như Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và/hoặc môi trường lên men trong và/hoặc sau quá trình sản xuất biến thể ALDC để làm tăng hiệu suất được thu hồi từ vi sinh vật.

Thuật ngữ "môi trường nuôi cấy" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường hỗ trợ sự sinh trưởng của vi sinh vật như tế bào chủ tái tổ hợp sản xuất biến thể ALDC. Ví dụ về môi trường nuôi cấy bao gồm: môi trường dựa trên chất đệm MOP với, chẳng hạn, ure làm nguồn nitơ chính và maltrin làm nguồn cacbon chính; và canh TSB. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim

loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của polypeptit tái tổ hợp này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1000 đến 35000 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Có thể bổ sung nguyên liệu vào chế phẩm chứa enzym để cải thiện các tính chất của chế phẩm. Ví dụ không giới hạn về các chất phụ gia như vậy bao gồm: muối (ví dụ, muối kiềm, muối kim loại kiềm thổ, các muối clorua bổ sung, muối sulfat, muối nitrat, muối cacbonat, trong đó ion trái dấu nêu làm ví dụ là canxi, kali, và natri), khoáng vật hoặc đất sét vô cơ (ví dụ, zeolit, cao lanh, bentonit, bột talc và/hoặc silicat), carbohydrat (ví dụ, sucroza và/hoặc tinh bột), sắc tố tạo màu (ví dụ, titan đioxit), thuốc diệt sinh vật (ví dụ, Rodalon®, Proxel®), chất phân tán, chất chống bọt, chất khử, chất axit, chất kiềm, chất làm ổn định enzym (ví dụ polyol như glyxerol, propylen glycol, sorbitol, muối vô cơ, đường, đường hoặc rượu đường, axit lactic, axit boric, hoặc dẫn xuất axit boric và hỗn hợp của chúng), chất ức chế enzym, chất bảo quản (ví dụ metyl paraben, propyl paraben, benzoat, sorbat hoặc các chất bảo quản khác được chứng nhận dùng trong thực phẩm) và hỗn hợp của chúng. Các tá dược có thể được sử dụng trong chế phẩm, hoặc trong quá trình điều chế chúng, bao gồm maltoza, xi-rô maltoza, sucroza, glucoza (bao gồm xi-rô glucoza hoặc xi-rô glucoza khô), tinh bột được nấu sơ bộ, tinh bột được gelatin hóa, L-lactic, ascorbyl palmitat, tocopherol, lexitin, axit xitric, xitrat, phosphoric, phosphat, natri alginat, carrageenan, gân đậu cào cào (locust bean), gân guar, gân xanthan, pectin, natri carboxymetylxenluloza, mono- và diglyxerit, este axit xitric của mono- và diglyxerit, sucroza este, cacbon đioxit, argon, heli, nitơ, nitơ oxit, oxy, hydro, và tinh bột natri octenylsuccinat.

Phương pháp

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện độ ổn định và/hoặc hoạt tính của enzym ALDC. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự thu hồi biến thể ALDC từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC trong chế phẩm có chứa biến thể ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào chế phẩm sao cho ion kim loại này có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến

khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 μM , hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM , hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM , hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM , hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của ALDC biến thể trong môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào môi trường sao cho ion kim loại này có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM , như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của ALDC biến thể trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín có chứa ALDC biến thể, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào môi trường sao cho ion kim loại này có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM trong môi trường. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} .

Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} .

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC trong chế phẩm có chứa ALDC, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào chế phẩm sao cho kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC trong môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ (tái tổ hợp) sản xuất biến thể ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín có chứa biến thể ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào môi trường sao cho kẽm có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm vào môi trường sao cho kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM trong môi trường này. Theo một số phương án,

phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với ALDC biến thể cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc 100:1, hoặc 150:1, hoặc 200:1 hoặc 250:1 trong chế phẩm. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với biến thể ALDC bằng 5:1 hoặc lớn hơn trong chế phẩm. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với biến thể ALDC bằng 10:1 hoặc lớn hơn trong chế phẩm. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với biến thể ALDC bằng 20:1 hoặc lớn hơn trong chế phẩm. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của biến thể ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với biến thể ALDC bằng 30:1 hoặc lớn hơn trong chế phẩm.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung (ví dụ dưới dạng chất bổ sung) vào môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất biến thể ALDC bởi tế bào chủ sản xuất ALDC. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 1 mM, như từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án kẽm được bổ sung (ví dụ dưới dạng chất bổ sung) vào môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất biến thể ALDC này bởi tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 25 μM

đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ 60 μM đến khoảng 150 μM .

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ *Bacillus*. Theo một số phương án, tế bào chủ *Bacillus* là *Bacillus subtilis*.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình sản xuất đồ uống lên men. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, kẽm được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, kẽm và biến thể ALDC được bổ sung trong chế phẩm, trong đó kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,1 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ 1 mM đến 5 mM. Theo một số phương án kẽm và biến thể ALDC được bổ sung trong chế phẩm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với biến thể ALDC trong chế phẩm cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường ủ chín trong quá trình sản xuất đồ uống lên men. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung môi trường ủ chín trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương

án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, kẽm được bổ sung trong môi trường ủ chín trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án kẽm và ALDC được bổ sung trong chế phẩm, trong đó kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án kẽm và enzym ALDC biến thể được bổ sung trong chế phẩm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC biến thể trong chế phẩm cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất axetoin được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp phân hủy axetolactat được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axetolactat được phân hủy thành axetoin. Các phương pháp này bao gồm bước xử lý cơ chất bằng ALDC biến thể và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại và ALDC biến thể được bổ sung trong chế phẩm, trong đó ion kim loại có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM

đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án ion kim loại và biến thể ALDC được bổ sung trong chế phẩm, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với biến thể ALDC trong chế phẩm cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước xử lý cơ chất bằng biến thể ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, kẽm và biến thể ALDC được bổ sung trong chế phẩm, trong đó kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án kẽm và enzym ALDC biến thể được bổ sung trong chế phẩm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC biến thể trong chế phẩm cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất axetoin trong quá trình sản xuất đồ uống lên men được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp phân hủy axetolactat trong quá trình sản xuất đồ uống lên men được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axetolactat được phân hủy thành axetoin.

Sản phẩm lên men

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm rượu lên men có hàm lượng diacetyl thấp bằng cách lên men cơ chất chứa carbohydrat với vi sinh vật. Như được sử dụng ở đây, sản phẩm rượu lên men có "hàm lượng diacetyl thấp" chỉ sản phẩm rượu lên men (ví dụ bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xakê) được sản xuất bằng cách lên men cơ chất chứa carbohydrat với chế phẩm có chứa biến thể ALDC với sự có mặt của ion kim loại (như kẽm) trong đó mức diacetyl là thấp

hơn khi so với rượu lên men được sản xuất bằng cách lên men cơ chất chứa carbonhydrat với chế phẩm có chứa biến thể ALDC khi không có ion kim loại (như kẽm) trong cùng điều kiện lên men (ví dụ cùng nhiệt độ và trong cùng khoảng thời gian). Ví dụ về sản phẩm rượu lên men có hàm lượng diacetyl thấp là sản phẩm rượu lên men trong đó mức diacetyl ít hơn khoảng 1 ppm và/hoặc mức diacetyl dưới khoảng 0,5 mg/l. Theo một phương án, mức diacetyl ít hơn khoảng 0,5 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,1 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,05 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,01 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,001 ppm. Theo một phương án, mức diacetyl khoảng ít hơn 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,01 mg/l hoặc khoảng ít hơn 0,001 mg/l.

Khi cơ chất chứa carbonhydrat, như hèm rượu (ví dụ hèm rượu có hàm lượng mạch nha thấp) hoặc nước trái cây (như nước nho, nước táo hoặc nước lê), được lên men với nấm men hoặc các vi sinh vật khác, các quy trình khác nhau diễn ra ngoài quy trình lên men mà có thể tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn, ví dụ, tạo ra diacetyl có mùi mạnh và khó chịu ngay cả ở nồng độ rất thấp. Đồ uống có cồn, như bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê, do đó có thể có mùi và hương vị không chấp nhận được nếu hàm lượng diacetyl lớn hơn đáng kể giới hạn nhất định cho phép, ví dụ, trong trường hợp một số bia, hàm lượng này vào khoảng 0,1 ppm.

Việc tạo thành diacetyl cũng bất lợi trong quá trình sản xuất ethanol trên quy mô công nghiệp vì khó tách diacetyl khỏi ethanol bằng cách chưng cất. Vấn đề cụ thể nảy sinh trong quá trình điều chế ethanol tuyệt đối trong đó ethanol được loại nước bằng cách chưng cất đồng sôi với benzen. Diacetyl sẽ tích lũy trong pha benzen trong quá trình chưng cất đồng sôi, điều này có thể làm tăng hỗn hợp của diacetyl và benzen làm cho khó thu hồi benzen được sử dụng cho chưng cất đồng sôi.

Quy trình ủ bia thông thường bao gồm lên men hèm rượu với loài nấm men thích hợp, như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Saccharomyces carlsbergensis*.

Trong quy trình ủ thông thường, quá trình lên men thường được thực hiện trong hai bước, lên men chính trong khoảng thời gian bình thường từ 5 đến 12 ngày và lên men phụ, còn được gọi là quá trình ủ chín –quá trình này có thể diễn ra đến 12 tuần. Trong quá trình lên men chính, hầu hết carbonhydrat trong hèm rượu được biến đổi thành ethanol và cacbon đioxit. Quá trình ủ chín thường được thực hiện ở nhiệt độ thấp với sự có mặt lượng ít nấm men còn lại. Mục đích của việc ủ chín là, không kể những

mục đích khác, để kết tủa hợp chất có khối lượng phân tử cao, không mong muốn và để biến đổi hợp chất không mong muốn thành các hợp chất, như diol, mà không ảnh hưởng đến hương vị và mùi thơm. Ví dụ, butandiol, sản phẩm cuối cùng của sự biến đổi α -axetolactat và diaxetyl trong bia, thường được báo cáo là hợp chất có đặc tính nhận cảm trung hòa. Thuật ngữ "môi trường lên men" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường có chứa cơ chất chứa carbohydrat mà có thể được lên men bởi nấm men hoặc các vi sinh vật khác để sản xuất, ví dụ, bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê. Ví dụ về môi trường lên men bao gồm: hèm rượu, và nước trái cây (như nước nho, nước táo và nước lê). Thuật ngữ "môi trường ủ chín" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường có chứa cơ chất chứa carbohydrat đã được lên men bởi nấm men hoặc các vi sinh vật khác để sản xuất, ví dụ, bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê. Ví dụ về môi trường ủ chín bao gồm hèm rượu và nước trái cây được lên men một phần (như nước nho, nước táo và nước lê).

Theo một số khía cạnh, việc sử dụng chế phẩm như mô tả ở đây trong việc lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê được đề xuất. Theo một số phương án, các chế phẩm có chứa các biến thể ALDC được dùng để phân hủy axetolactat trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Ngoài ra, việc sử dụng dẫn xuất ALDC biến thể cũng được đề xuất để phân hủy axetolactat trong quá trình lên men bia, rượu vang, rượu táo, cá rô hoặc rượu sake (hoặc ủ chín).

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế do đó được đặc trưng bởi việc xử lý cơ chất bằng chế phẩm có chứa ALDC biến thể hoặc dẫn xuất ALDC biến thể như được mô tả trong bản mô tả này trong quá trình lên men hoặc quá trình tiếp theo quá trình lên men, ví dụ, quá trình ủ chín.

Do đó, theo một số phương án, axetolactat được tách nhóm carboxyl nhờ enzym thành axetoin, kết quả là tránh được sự tạo thành diaxetyl từ axetolactat khi không mong muốn. Theo một số phương án, các enzym khác được sử dụng kết hợp với các biến thể ALDC để biến đổi α -axetolactat. Ví dụ về các enzym này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axetolactat reductoisomerase hoặc isomerase.

Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng cùng với nấm men thông thường trong quá trình lên men theo mẻ.

Thay vì sử dụng enzym ở trạng thái tự do, có thể sử dụng enzym ở trạng thái được giữ cố định, enzym được giữ cố định này được bổ sung vào hèm rượu trong quá trình lên men hoặc quá trình tiếp theo quá trình lên men (ví dụ, trong quá trình ủ chín). Enzym được giữ cố định cũng có thể được duy trì trong cột mà qua đó hèm rượu lên men hoặc bia được đi qua. Enzym có thể được giữ cố định riêng rẽ, hoặc nấm men được cùng giữ cố định và axetolactat decarboxylaza có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được sử dụng trong quá trình lên men (hoặc ủ chín) bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê để làm giảm mức diacetyl xuống dưới khoảng 1 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,5 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,1 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,05 ppm hoặc khoảng ít hơn 0,01 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,001 ppm.

Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê để làm giảm hàm lượng VDK dưới 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc ít hơn 0,01 mg/l hoặc ít hơn 0,001 mg/l. VDK tổng chỉ lượng diacetyl cộng với 2,3-pentandion. Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê để làm giảm tổng hàm lượng VDK dưới 0,1 mg/L.

Các quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng không chỉ liên quan đến quá trình ủ bia, mà cũng thích hợp để sản xuất đồ uống có cồn thích hợp bất kỳ trong đó mong muốn làm giảm mức diacetyl hoặc các diketone kế cận khác (ví dụ rượu vang, rượu xa-kê, rượu táo, rượu lê, v.v.). Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng trong sản xuất rượu vang để thu được các ưu điểm tương tự, cụ thể làm giảm thời gian ủ chín và làm đơn giản hóa quy trình. Được đặc biệt quan tâm theo sáng chế là việc sử dụng enzym biến đổi axetolactat liên quan đến quy trình gọi là quy trình lên men malo-lactic. Quy trình này bị ảnh hưởng bởi các vi sinh vật như loài *Leuconostoc*, *Lactobacillus* hoặc *Pediococcus* được tiến hành sau quá trình lên men chính của rượu vang để làm tăng độ pH của sản phẩm cũng như độ ổn định sinh học của nó và gia tăng hương vị của rượu vang. Hơn nữa, đặc biệt mong muốn tiến hành lên men vì quá trình này giúp đóng chai nhanh chóng và nhờ đó cải thiện dòng tiền của các nhà máy sản xuất rượu vang một cách đáng kể. Tuy nhiên, không may là, quy trình này

có thể làm tăng các hương vị lạ do diaxetyl, việc tạo thành các hương vị lạ này có thể được làm giảm nhờ sự trợ giúp của enzym biến đổi axetolactat.

Do đó, theo một số phương án, các quy trình đề xuất việc sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng diaxetyl thấp hơn, trong đó thời gian cần thiết để sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng diaxetyl thấp hơn được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế đề xuất việc sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng diaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men (ví dụ lên men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê), sao cho thời gian cần thiết cho quá trình lên men được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế đề xuất việc sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng diaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Theo một số phương án, chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình ủ chín hoặc quá trình điều hòa (ví dụ ủ chín/điều hòa bia), sao cho thời gian cần thiết cho quá trình ủ chín hoặc quá trình điều hòa được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế đề xuất việc sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng diaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng chế phẩm

ALDC biến thể và/hoặc chế phẩm dẫn xuất ALDC biến thể được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Ngoài ra, theo một số phương án, các quy trình mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình sản xuất etanol trên quy mô công nghiệp vì sản phẩm lên men thu được không có hoặc gần như không có hàm lượng diacetyl bất kỳ, điều này làm đơn giản hóa quy trình chưng cất, đặc biệt là trong trường hợp chưng cất đồng sôi để điều chế etanol tuyệt đối, tức là etanol khan tinh khiết.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm việc bổ sung chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê sao cho ion kim loại có mặt trong chế phẩm này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} .

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung chế phẩm có chứa ALDC biến thể (enzym) và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong chế phẩm này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200

mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, và chế phẩm có chứa ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung chế phẩm có chứa ALDC biến thể và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, và chế phẩm có chứa ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM hoặc khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, và chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM hoặc khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, và chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 2 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương

án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC biến thể này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC biến thể và ion kim loại trong chế phẩm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC biến thể cao hơn 1, và chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC biến thể và ion kim loại trong chế phẩm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với ALDC biến thể cao hơn 1, và chế phẩm có chứa ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC biến thể và ion kim loại trong chế phẩm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC biến thể cao hơn 1, và chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolit của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC biến thể và ion kim loại trong chế phẩm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC biến thể cao hơn 1, và chế phẩm có chứa enzym ALDC biến thể và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 2 g cho

mỗi hectolít của men bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC biến thể bằng 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc cao hơn. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của ALDC biến thể này nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 35000 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Sản xuất enzym ALDC

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến axit nucleic có khả năng mã hóa ALDC biến thể (enzym) như được mô tả trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến vector biểu hiện hoặc plasmit có chứa axit nucleic này, hoặc có khả năng biểu hiện enzym như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh, vector biểu hiện hoặc plasmit có chứa trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ *Trichoderma* như trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ cbhI *T. reesei*. Theo khía cạnh khác, vector biểu hiện hoặc plasmit có chứa trình tự kết thúc có nguồn gốc từ *Trichoderma* như trình tự kết thúc có nguồn gốc từ cbhI *T. reesei*. Theo khía cạnh khác nữa, vector biểu hiện hoặc plasmit có chứa một hoặc nhiều thành phần đánh dấu chọn lọc như amdS và pyrG *Aspergillus nidulans*. Theo khía cạnh khác, vector biểu hiện hoặc plasmit có chứa một hoặc nhiều vùng cuối cho phép duy trì plasmit không phải nhiễm sắc thể trong tế bào chủ.

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến tế bào chủ có sự biểu hiện khác loại của enzym như được mô tả trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác, tế bào chủ là tế bào nấm. Theo khía cạnh khác nữa, tế bào nấm thuộc chi *Trichoderma*. Theo khía cạnh khác nữa, tế bào nấm thuộc loài *Trichoderma reesei* hoặc thuộc loài *Hypocrea jecorina*. Theo khía cạnh khác, tế bào chủ có chứa, tốt hơn là được biến nạp với, plasmit hoặc vector biểu hiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ vi khuẩn như *Bacillus*. Theo một số phương án enzym được sản xuất bằng cách nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis*

chứa gen mã hóa và biểu ALDC biến thể như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về tế bào chủ như vậy và việc nuôi cấy chúng được mô tả trong DK149335B.

Ví dụ về vector biểu hiện và/hoặc vector tích hợp thích hợp được đưa ra trong Sambrook *et al.* (1989) *trên đây*, và Ausubel (1987) *trên đây*, và van den Hondel *et al.* (1991) trong Bennett and Lasure (Eds.) More Gene Manipulations In Fungi, Academic Press pp. 396-428 và Sáng chế Mỹ số 5,874,276. Tham khảo thêm danh sách vector trong tài liệu Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, <http://www.fgsc.net>). Các vector đặc biệt hữu dụng bao gồm các vector thu được từ Invitrogen và Promega chẳng hạn. Plasmid thích hợp để sử dụng trong tế bào vi khuẩn bao gồm pBR322 và pUC19 cho phép sao chép trong *E. coli* và pE194 chẳng hạn, cho phép sao chép trong *Bacillus*. Các vector đặc trưng khác thích hợp để sử dụng trong tế bào chủ *E. coli* bao gồm vector như pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDONRTM201, 10 pDONRTM221, pENTRTM, pGEM[®]3Z và pGEM[®]4Z.

Vector đặc trưng thích hợp để sử dụng trong tế bào nấm bao gồm pRAX, một vector biểu hiện mục đích chung hữu dụng trong *Aspergillus*, pRAX với trình tự khởi đầu *glaA*, và trong *Hypocrea/Trichoderma* bao gồm pTrex3g với trình tự khởi đầu *cbh1*.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào nấm và tùy ý là tế bào chủ nấm sợi. Thuật ngữ "nấm sợi" chỉ tất cả các dạng sợi của cấp phân loại phụ Eumycotina (xem; Alexopoulos, C. J. (1962), Introductory Mycology, Wiley, New York). Các nấm này được đặc trưng bởi thể sợi nấm sinh dưỡng với thành tế bào gồm chitin, xenluloza, và các polysacarit phức hợp khác. Nấm sợi theo sáng chế là khác biệt về mặt hình thái, sinh lý, và di truyền với nấm men. Sự phát triển sinh dưỡng bởi nấm sợi là bởi sự kéo dài sợi nấm và sự dị hóa cacbon là ưa khí bắt buộc. Theo sáng chế, tế bào nấm sợi cha mẹ có thể là tế bào thuộc loài, nhưng không giới hạn ở, *Trichoderma* (ví dụ, *Trichoderma reesei*, kiểu hình thái vô tính của *Hypocrea jecorina*, trước đây được phân loại là *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53 (1984); ATCC No. 56765 và ATCC No. 26921), *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (ví dụ, *H. insolens*, *H. lanuginosa* và *H. grisea*), *Chrysosporium* sp. (ví dụ, *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (ví dụ, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, và *A. awamori*) (Ward et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743 (1993) và

Goedegebuur *et al.*, *Curr. Genet.* 41:89 -98 (2002)), *Fusarium sp.*, (ví dụ, *F. roseum*, *F. graminum*, *F. cerealis*, *F. oxysporum*, và *F. venenatum*), *Neurospora sp.*, (*N. crassa*), *Hypocrea sp.*, *Mucor sp.* (*M. miehei*), *Rhizopus sp.*, và *Emericella sp.* (tham khảo thêm Innis *et al.*, *Science* 228:21 -26 (1985)). Thuật ngữ "*Trichoderma*" hoặc "*Trichoderma sp.*" hoặc "*Trichoderma spp.*" dùng để chỉ chi nấm bất kỳ đã được phân loại hoặc hiện đang được phân loại là *Trichoderma*.

Theo một số phương án, tế bào chủ sẽ là tế bào vi khuẩn gram dương. Ví dụ không giới hạn bao gồm chủng *Streptomyces* (ví dụ, *S. lividans*, *S. coelicolor*, và *S. griseus*) và *Bacillus*. Như được sử dụng ở đây, "giống *Bacillus*" bao gồm tất cả các loài trong giống "*Bacillus*," như đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực, bao gồm, nhưng không giới hạn ở *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, và *B. thuringiensis*. Đã nhận thấy rằng giống *Bacillus* tiếp tục trải qua sự tái cấu trúc phân loại. Do đó, dự định rằng giống này bao gồm các loài đã được tái phân loại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các sinh vật như *B. stearothermophilus*, mà hiện nay được đặt tên là "*Geobacillus tearothermophilus*."

Theo một số phương án, tế bào chủ là chủng vi khuẩn gam dương như *E. coli* or *Pseudomonas sp.* Theo các phương án khác, tế bào chủ có thể là tế bào nấm men như *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, or *Candida sp.* Theo các phương án khác, tế bào chủ sẽ là tế bào chủ được thiết kế di truyền trong đó các gen nguyên thể đã được làm bất hoạt, ví dụ bằng cách làm khuyết trong tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm. Khi mong muốn thu được tế bào chủ dạng nấm có một hoặc nhiều gen đã được làm bất hoạt, có thể sử dụng các phương pháp đã biết (ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong Sáng chế Mỹ số 5,246,853, Sáng chế Mỹ số 5,475,101, và WO 92/06209). Sự bất hoạt gen có thể được thực hiện bằng cách làm khuyết một phần hoặc hoàn toàn, bằng bất hoạt cài xen hoặc bằng biện pháp bất kỳ khác làm cho gen không có chức năng cho mục đích dự định của nó (sao cho gen được ngăn không biểu hiện protein chức năng). Theo một số phương án, khi tế bào chủ là tế bào *Trichoderma* và cụ thể là tế bào chủ *T. reesei*, các gen *cbh1*, *cbh2*, *egl1* và *egl2* sẽ được hoạt hóa và/hoặc bị làm khuyết. Tế bào chủ *Trichoderma reesei* nêu làm ví dụ có bốn protein bị làm khuyết được nêu và mô tả trong Sáng chế Mỹ số 5,847,276 và WO 05/001036. Theo các

phương án khác, tế bào chủ là chủng thiếu hụt proteaza hoặc không có proteaza. Thuật ngữ chủng "thiếu hụt proteaza" hoặc "chủng không có proteaza" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào chủ thu được hoặc có khả năng thu được từ tế bào cha mẹ trong đó tế bào chủ này có chứa một hoặc nhiều biến đổi di truyền làm cho tế bào chủ sản xuất một hoặc nhiều proteaza (ví dụ proteaza chức năng) với lượng giảm khi so với tế bào cha mẹ; tốt hơn là tế bào chủ này thiếu hụt một hoặc nhiều proteaza được chọn từ nhóm bao gồm WprA, Vpr, Epr, IspA, Bpr, NprE, AprE, ampS, aprX, bpf, clpCP, clpEP, clpXP, codWX, lonA, lonB, nprB, map, mlpA, mpr, pepT, pepF, dppA, yqyE, tepA, yfiT, yfiG, ymfF, ypwA, yrrN, yrrO, và ywaD. Tế bào chủ biến thể có nguồn gốc từ tế bào cha mẹ được tạo ra, tế bào chủ biến thể này có chứa một hoặc nhiều biến đổi di truyền làm cho tế bào của chủng biến thể sản xuất một hoặc nhiều proteaza với lượng giảm khi so với tế bào cha mẹ.

Việc đưa vectơ hoặc cấu trúc ADN vào tế bào chủ bao gồm các kỹ thuật như biến nạp; đục lỗ điện; vi tiêm nhân; tải nạp; chuyển nhiễm, (ví dụ, chuyển nhiễm qua trung gian liposom và chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-Dextrin); ủ với chất kết tủa ADN canxi phosphat; bắn vi đạn phủ ADN với tốc độ cao; và dung hợp tế bào trần. Các kỹ thuật biến nạp chung là đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Ausubel *et al.* (1987) trên đây, chương 9; và Sambrook *et al.* (1989) trên đây, và Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989)).

Phương pháp biến nạp đối với *Bacillus* được bộc lộ trong nhiều tài liệu tham khảo khác nhau bao gồm Anagnostopoulos C. and J. Spizizen, *J. Bacteriol.* 81:741-746 (1961) và WO 02/14490.

Phương pháp biến nạp đối với *Aspergillus* được mô tả trong Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474 (1984); Berka *et al.*, (1991) trong Applications of Enzyme Biotechnology, Eds. Kelly and Baldwin, Plenum Press (NY); Cao *et al.*, *Protein Sci.* 9:991-1001 (2000); Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989), và EP 238 023. Sự biểu hiện của protein khác loại trong *Trichoderma* được mô tả trong Sáng chế Mỹ số 6,022,725; Sáng chế Mỹ số 6,268,328; Harkki *et al.* *Enzyme Microb. Technol.* 13:227-233 (1991); Harkki *et al.*, *BioTechnol.* 7:596-603 (1989); EP 244,234; EP 215,594; và Nevalainen *et al.*, "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", trong Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992)

pp. 129-148). Tham khảo thêm W096/00787 và Bajar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8202-8212 (1991) về việc biến nạp chủng *Fusarium*.

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến phương pháp phân lập ALDC biến thể như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm bước gây tổng hợp ALDC biến thể trong tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này có sự biểu hiện khác loại của ALDC biến thể và thu hồi protein ngoại bào được tiết ra bởi tế bào chủ này, và tùy ý tinh chế enzym. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến phương pháp sản xuất enzym như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm bước tạo sự tổng hợp enzym trong tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này có sự biểu hiện khác loại của enzym này, và tùy ý tinh chế enzym. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến phương pháp biểu hiện enzym như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm thu tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này, hoặc tế bào chủ thích hợp bất kỳ đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực, và biểu hiện enzym từ tế bào chủ này, và tùy ý tinh chế enzym. Theo khía cạnh khác, enzym như được xác định trong bản mô tả này là protein bài tiết chiếm ưu thế.

Theo một số phương án, ion kim loại như Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng được bổ sung vào môi trường (như môi trường nuôi cấy và/hoặc môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) trong quá trình sản xuất và/hoặc sau quá trình sản xuất enzym để làm tăng hiệu suất được thu hồi từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong

khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của ALDC biến thể này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Thuật ngữ "tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào chủ (tái tổ hợp) có khả năng biểu hiện ít nhất một ALDC biến thể (như được mô tả trong bản mô tả này) khi tế bào chủ này được nuôi cấy dưới các điều kiện cho phép biểu hiện trình tự axit nucleic mã hóa ALDC biến thể. Trình tự axit nucleic mã hóa ALDC biến thể có thể khác loại hoặc đồng nhất với tế bào chủ. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC là *Bacillus subtilis*. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa gen mã hóa và biểu hiện ALDC biến thể trong đó ALDC biến thể có chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 98%, 100% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO: 3, và trong đó polypeptit có chứa ít nhất một sự thể axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa trình tự axit nucleic mã hóa ALDC biến thể trong đó trình tự axit nucleic mã hóa ALDC biến thể này có ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO: 6 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất biến thể ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa gen mã hóa biến thể ALDC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 (protein trưởng thành).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ sau, các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn theo cách bất kỳ phạm vi của sáng chế như được yêu cầu bảo hộ. Các hình vẽ đính kèm được dự định xem là các phần không thể thiếu để xác định đặc điểm và mô tả sáng chế. Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa, mà không nhằm mục đích giới hạn sáng chế như được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1***Biểu hiện khác loại của axetolactat decarboxylaza, aldB***

Gen aldB *Brevibacillus brevis* (có thể được gọi là *Bacillus brevis*) axetolactat decarboxylaza (ALDC) đã được xác định từ trước (Diderichsen et al., *J Bacteriol.* (1990) 172(8): 4315), với trình tự được nêu với Mã Truy cập UNIPROT số P23616.1. Trình tự của gen này, aldB, được minh họa trong SEQ ID NO:1. Các nucleotit được in đậm và gạch chân là các nucleotit mã hóa peptit tín hiệu. Gen aldB và tiền enzym mã hóa tương ứng còn gọi là kiểu dại (WT).

SEQ ID NO: 1 nêu trình tự nucleotit của gen aldB:

atgaaaaaaaaatatcatcacttctatcacatctctggctctggtgccgggctgtctttgactgctttgcagctacaacgg
ctactgtaccagcaccacctgccagcaggaatccaaacctgcggtgccgctaataccggcaccaaaaaatgtactgtttcaat
actcaacgatcaatgcactcatgcttgacagttgaaggggacttgactttgaaagacctgaagctgcgagggcgatatgggg
cttggtaccatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcgacagcaccggaaaattatcg
gagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaactacattaaccaatgtgcaa
gattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaatttgaacaagaacgtctttatgccgtaaagctgaccggtaccttta
gatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactgaagtaacaaaaacaatccgagtttg
aatttaaaaatgttaagggaaccctgattggcttctatacgccaaattatgcagcagccctgaatgttccggattccatctccact
tcacacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaaatctgcaatttgacaacgcgaatctggaaatttctccgatccatg
agtttgatgtacaattgccgcacacagatgatttggccactctgatctgacacaagtactactagccaagtacaccaagctga
gtcagaaagaaaataa

Proenzym mã hóa bởi gen aldB được mô tả trong SEQ ID NO: 2. Ở đầu tận cùng N, protein này có peptit tín hiệu có chiều dài 24 axit amin như được dự đoán bởi SignalP-NN (Emanuelsson et al., *Nature Protocols* (2007) 2: 953-971). Trình tự peptit tín hiệu này được gạch chân và in đậm trong SEQ ID NO:2. Sự có mặt của peptit tín hiệu chỉ ra rằng axetolactat decarboxylaza, aldB này là enzym được tiết. Trình tự của chuỗi trưởng thành, đã được xử lý đầy đủ, theo dự đoán (aldB, 261 axit amin) được mô tả trong SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 2 nêu trình tự axit amin của tiền chất aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC):

MKKNIITSITSLALVAGLSLTAFAATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVL
FQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDS
TGKLSPELVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVY

AVKLTGTFKMKVARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLLIGFYTPNY
AAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAH
SDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 3 nêu trình tự axit amin được dự đoán của *aldB* axetolactat decarboxylaza (ALDC) trưởng thành (261 axit amin):

ATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLK
LRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKE
KTTLTNVQDYNQLTKMLEEFENKNVFYAVKLTGTFKMKVARTVPKQTRPYP
QLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVL
NLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

Gen *aldB* mã hóa enzyme axetolactat decarboxylaza (ALDC) được sản xuất trong *B. Subtilis* sử dụng gen tổng hợp được chèn vào vector pSVH1, xem Fig.1. Vị trí của gen *aldB* chứa trình tự tín hiệu *aldB* là sau “vùng gen khởi động *aprE*” với “AGA” bổ sung ở đầu 5’. Để biểu hiện vector pSVH1_Bbrev_aldB được biến nạp vào chủng *B. subtilis* thích hợp. Bản đồ của vector pSVH1 chứa gen *aldB* (pSVH1_Bbrev_aldB) được thể hiện trên Fig.2.

Để sản xuất *aldB*, thể biến nạp chủng *B. subtilis* chứa pSVH1_Bbrev_aldB được nuôi cấy trong ống Falcon dung tích 15 mL trong 16 giờ trong TSB (canh) với 10 ppm neomycin, và 300 μ L môi trường tiền nuôi cấy này được bổ sung vào bình dung tích 500 mL được nạp 30 mL môi trường nuôi cấy (được mô tả dưới đây) được bổ sung 10 ppm neomycin. Các bình này được ủ trong 24, 48 và 72 giờ ở nhiệt độ 33°C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút. Các giống cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 14500 vòng/phút trong 20 phút trong ống hình nón. Các dịch nổi bề mặt nuôi cấy được sử dụng để xác định và thử nghiệm protein. Môi trường nuôi cấy là môi trường bán định nghĩa được làm giàu dựa trên chất đệm MOP, với urê là nguồn nitơ chính, glucoza là nguồn carbon chính, 50 μ M ZnSO₄ để đảm bảo hoạt tính enzyme cao và được bổ sung 1% soyton để đẩy mạnh tăng trưởng tế bào.

Trình tự nucleotit trưởng thành của gen *aldB* trong plasmit pSVH1_Bbrev_aldB được mô tả trong SEQ ID NO:4.

gctacaacggctactgtaccagcaccacctgccagcaggaatccaaacctgcggttgccgctaataccggcaccaaaaaaat
gtactgtttcaataactcaacgatcaatgcactcatgcttgacagtttgaaggggacttgactttgaaagacctgaagctgcgag
gcgatatggggccttggtaccatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcgacagcacc

ggaaaattatcggagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaactacatta
 accaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaatttgaaaacaagaacgtctttatgccgtaaaagctga
 ccggtacttttaagatggttaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactgaagtaacaaaaaa
 caatccgagtttgaatttaaaaaatgtaagggaaccctgattggcttctatagccaaattatgcagcagccctgaatgttccgg
 attccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaaatctgcaatttgacaacgcgaatctggaaatt
 tctccgatccatgagtttgatgttcaattgccgcacacagatgatttgcctctgatctgacacaagttactactagccaagta
 caccaagctgagtcagaaagaaaa

Trình tự axit amin của protein tiền aldB được biểu hiện từ plasmit pSVH1_Bbrev_aldB được mô tả trong SEQ ID NO:5.

*vrskklwisllfaltliftmafsnmsaqa*ATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTI
 NALMLGQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSE
 LPESVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVFYAVKLTG
 TFKMVKARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLIGFYTPNYAAALNV
 PGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVT
 TSQVHQAESERK

Biến thể gen *aldB* mã hóa biến thể axetolactat decarboxylaza enzym (ALDC) với sự thế axit amin Threonine thành Alanine ở vị trí 62 (T62A) được tạo ra là gen tổng hợp và được chèn vào vector pSVH1 như được mô tả ở trên cho gen *aldB* kiểu đại.

Trình tự nucleotit của gen biến thể *aldB_T62A* trong plasmit pSVH1_Bbrev_aldB_T62A được mô tả trong SEQ ID NO:6.

gtgagaagcaaaaaattgtggatcagcttgttgttgcgttaacgttaatctttacgatggcgttcagcaacatgagcgc
gcaggctgctacaacggctactgtaccagcaccacctgccaaagcaggaatccaaacctgcggttgccgtaatccggcacc
 aaaaaatgtactgtttcaatactcaacgatcaatgcactcatgcttgacagtttgaaggggacttgactttgaaagacctgaag
 ctgcgaggcgatatggggcttggtgcaatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcga
 cagcaccggaaaattatcggagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaaa
 ctacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaatttgaaaacaagaacgtctttatgccgta
 aagctgaccggtacttttaagatggttaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactgaagtaac
 caaaaaacaatccgagtttgaatttaaaaaatgtaagggaaccctgattggcttctatagccaaattatgcagcagccctgaat
 gtcccggttccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaaatctgcaatttgacaacgcgaatc
 tggaaatttctccgatccatgagtttgatgttcaattgccgcacacagatgatttgcctctgatctgacacaagttactactag
 ccaagtacaccaagctgagtcagaaagaaaaataa

Trình tự axit amin của protein tiền aldB_T62A được biểu hiện từ plasmit

pSVH1_Bbrev_aldB_T62A được mô tả trong SEQ ID NO:7.

VRSKKLWISLLFALTTLIFTMAFSNMSAQAATTATVPAPPAKQESKPAVAANP
APKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGAINDLGEMIQMGT
KFYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFE
NKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTVPAKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLIG
FYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHT
DDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 8 nêu trình tự axit amin được dự đoán của axetolactat decarboxylaza aldB_T62A biến thể trưởng thành (261 axit amin):

ATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLK
LRGDMGLGAINDLGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKE
KTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFNKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTVPAKQTRPYP
QLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVL
NLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK.

Điều kiện nuôi cấy quy mô nhỏ

Để sản xuất aldB, thể biến nạp chủng *B. subtilis* chứa catxet biểu hiện aldB được nuôi cấy trong ống Falcon dung tích 15 mL trong 5 giờ trong TSB (canh) với 10 ppm neomycin, và 300 μ l môi trường tiền nuôi cấy này được bổ sung vào bình dung tích 500 mL được nạp 30 mL môi trường nuôi cấy (được mô tả dưới đây) được bổ sung 10 ppm neomycin và 50 μ M Zn^{2+} . Các bình này được ủ trong 24, 48 và 72 giờ ở nhiệt độ 33°C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút. Các giống cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 14500 vòng/phút trong 20 phút trong ống hình nón. Các dịch nổi bề mặt nuôi cấy được sử dụng để xác định và thử nghiệm protein. Môi trường nuôi cấy là môi trường bán xác định được làm giàu dựa trên chất đệm MOP, với ure là nguồn nitơ chính, maltrin là nguồn cacbon chính.

Điều kiện lên men cấp thức ăn theo mẻ

Để sản xuất aldB, thể biến nạp chủng *B. subtilis* chứa catxet biểu hiện aldB được nuôi cấy trong bình dung tích 250 mL chứa 30 mL môi trường phức hợp với 10 ppm neomycin. Bình này được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37 °C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút.

Nuôi cấy được chuyển vào thiết bị lên men có khuấy chứa 7 lít thành phần môi trường vô trùng như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây. Nhiệt độ được kiểm soát ở 37

°C; pH được kiểm soát ở 7,5 sử dụng amoni hydroxit làm dung dịch chuẩn kiềm; oxy hòa tan được duy trì ở 40% hoặc cao hơn bằng cách duy trì dòng khí ở tốc độ dòng 7 lít/phút, áp suất dư không đổi bằng 1 bar và điều chỉnh tốc độ khuấy. Khi glucoza ban đầu đã được sử dụng hết profin cấp để cấp dung dịch glucoza nồng độ 60% vào thiết bị lên men được bắt đầu (tốc độ cấp ban đầu là 20 g/giờ tăng tuyến tính đến 32,8 g/giờ trong hơn 7 giờ và được giữ không đổi ở tốc độ đó cho đến khi kết thúc lên men).

Thời gian lên men tổng cộng là 44 giờ.

Bảng 1. Công thức pha chế môi trường để lên men ALDC

Thành phần	Công thức pha chế Nồng độ (g/kg)
Bột đậu tương	50,0
Axit xitric	0,10
Magie sulfat heptahydrat	2,29
Kali Phosphat, Mono Bazơ	5,44
Sắt (II) sulfat, heptahyhydrat	0,029
Mangan Sulfat Mono hydrat	0,051
Kẽm sulphat heptahyhydrat	0,001
Glucoza mono hydrat	1,10
Chất chống bọt	3,00

Ví dụ 2

Phương pháp xác định protein

Xác định protein nhờ tiêu chuẩn của bộ tạo ảnh không có chất nhuộm

Protein được định lượng bằng gel SDS-PAGE và máy đo độ đục sử dụng hệ tạo ảnh Gel Doc™ EZ. Các thuốc thử được sử dụng trong thử nghiệm: Chất đệm mẫu Laemmli cô đặc (2x) (Bio-Rad, Catalô #161-0737); XT 26 giếng 4-12 % Bis-Tris Gel (Bio-Rad, Catalô #345-0125); gen đánh dấu protein "Precision Plus Protein Standards" (Bio-Rad, Catalô #161- 0363); protein BSA chuẩn (Thermo Scientific, Catalô #23208) và SimplyBlue Safestain (Invitrogen, Catalô #LC 6060. Thử nghiệm được tiến hành như sau: Trong đĩa PCR có 96 giếng 50µl mẫu enzym đã được pha loãng được trộn với 50 µl chất đệm mẫu chứa 2,7 mg DTT. Đĩa được bít kín bằng Màng vi bít kín 'B' từ

Bio-Rad và được đặt vào thiết bị PCR để được gia nhiệt đến 70 °C trong 10 phút. Sau đó, ngăn được nạp đệm chạy, catxet gel được thiết lập. Sau đó, 10 µl mỗi mẫu và mẫu chuẩn (0,125-1,00 mg/ml BSA) được nạp lên trên gel và 5 µl chất chỉ thị được nạp. Sau đó, tiến hành điện di ở 200 V trong 45 phút. Sau khi điện di, gel được rửa 3 lần trong 5 phút trong nước, sau đó được nhuộm trong Safestain qua đêm và cuối cùng được khử nhuộm trong nước. Sau đó, gel được chuyển đến Bộ tạo ảnh. Phần mềm Image Lab được sử dụng để tính toán mật độ của mỗi băng. Nhờ biết được lượng protein của mẫu chuẩn, có thể thiết lập được đường cong hiệu chỉnh. Lượng mẫu có thể được xác định bởi mật độ của băng và đường cong hiệu chỉnh. Phương pháp định lượng protein được sử dụng để điều chế các mẫu enzym aldB axetolactat decarboxylaza được sử dụng cho các thử nghiệm được thể hiện trong các ví dụ tiếp theo.

Ví dụ 3

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính

Thử nghiệm phổ quang kế của α -axetolactat decarboxylaza

α -Axetolactat decarboxylaza (ALDC) xúc tác sự khử nhóm carboxyl của α -axetolactat thành axetoin. Sản phẩm phản ứng axetoin có thể được định lượng theo cách đo màu. Axetoin được trộn với α -naphtol và creatin tạo thành màu đỏ đặc trưng hấp thụ ở OD_{522nm}. Hoạt tính ALDC được tính toán dựa trên OD_{522 nm} và đường cong hiệu chỉnh axetoin. Thử nghiệm được tiến hành như sau: 20 mM cơ chất axetolactat được điều chế bằng cách trộn 100 µl etyl-2-axetoxi-2-metylaxetoaxetat (Sigma, Catalô# 220396) với 3,6 ml NaOH 0,5 M ở nhiệt độ 10 °C trong 10 phút. 20 ml MES 50 mM pH 6,0 được bổ sung, pH được điều chỉnh đến pH 6,0 và thể tích được điều chỉnh đến 25 ml bằng 50 mM MES pH 6,0. 80 µl cơ chất axetolactat 20 mM được trộn với 20 µl mẫu enzym đã được pha loãng trong 50 mM MES, pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05 % BRIJ 35 và 0,01 % BSA. Hỗn hợp cơ chất/enzym được ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 10 phút. Sau đó, 16 µl hỗn hợp cơ chất/enzym được chuyển đến 200 µl 1 M NaOH, 1,0 % α -naphtol (Sigma, Catalô# 33420) và 0,1 % creatin (Sigma, Catalô# C3630). Hỗn hợp cơ chất/enzym/thuốc thử màu được ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 20 phút và sau đó, đọc OD_{522 nm}. Một đơn vị hoạt tính ALDC được định nghĩa là lượng enzym sản xuất 1 µmol axetoin mỗi phút trong các điều kiện của thử nghiệm.

Ví dụ 4

Hoạt tính đặc hiệu của biến thể aldB và aldB-t62a

Thế biến nạp *B. subtilis* có chứa cat-xet biểu hiện *aldB* và *aldB_T62A* được nuôi cấy dưới các điều kiện tương tự như được mô tả trong Ví dụ 1 và dịch nổi nuôi cấy được lọc vô trùng được phân tích đối với protein *aldB* và hoạt tính ALDC như được mô tả trong Ví dụ 2 và 3. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2. Rõ ràng từ phân tích này là biến thể enzyme *aldB-T62A* được tiết ra có hoạt tính đặc hiệu cao hơn đáng kể so với enzyme *aldB* kiểu dại. Hoạt tính đặc hiệu của *aldB* được thấy là 994,1 U/mg trong khi hoạt tính đặc hiệu của *aldB-T62A* là 1700,8 U/mg, cao hơn khoảng 1,7 lần.

Bảng 2. Hoạt tính ALDC, nồng độ protein enzyme và hoạt tính đặc hiệu được tính toán của các mẫu lên men aldB.

			Tiêu chí	Hoạt tính
		Hoạt tính	Protein	Hoạt tính
		U/mL	mg/mL	U/mg
Mẫu 1	<i>aldB</i>	331,0	0,333	994,1
Mẫu 2	<i>aldB-T62A</i>	818,5	0,481	1700,8

Ví dụ 5

Hoạt tính đặc hiệu của biến thể *aldB* và *aldB-t62a* sau khi bổ sung kẽm

Hoạt tính của *aldB* đã được chứng minh trước đây là bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các ion kim loại hóa trị hai như Zn^{2+} , Mn^{2+} và Co^{2+} (xem Đơn sáng chế quốc tế số PCT/US16/33028 và PCT/US16/33043). Do đó, để nghiên cứu ảnh hưởng của kẽm đến hoạt tính đặc hiệu của *aldB* và *aldB_T62A*, trước hết tất cả các ion hóa trị hai được loại bỏ trong các mẫu enzyme và sau đó kẽm được bổ sung để lấy lại hoạt tính. Do đó, các chế phẩm enzyme của *aldB* và *aldB_T62A* được sản xuất trong *B. subtilis* như được mô tả trong Ví dụ 4 đã khử muối bằng cách sử dụng cột PD10 được chuẩn bị theo mô tả của nhà sản xuất và được cân bằng với 50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05% Brij, 0,01% BSA. Mẫu khử muối của *aldB* và *aldB_T62A* (xấp xỉ 1 mg/ml) sau đó được tách ion hóa trị hai bằng cách ủ với 80 mM EDTA trong 0,2x chất đệm thử nghiệm (50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05% Brij, 0,01% BSA) ở 37°C qua đêm. Vật liệu đã xử lý EDTA được khử muối hai lần trên cột PD10 bằng cách sử dụng nước khử khoáng để loại bỏ EDTA còn lại. Các mẫu được ủ với 0 hoặc 0,25 mM $ZnSO_4$ trong 1 giờ ở 55°C

và hoạt tính ALDC và nồng độ của protein AldB được xác định như mô tả trong Ví dụ 2 và 3 (xem Bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính ALDC, nồng độ protein enzyme và hoạt tính đặc hiệu được tính toán của các mẫu aldB khử muối.

		ZnSO ₄ mM	Hoạt tính U/mL	Tiêu chí Protein mg/mL	Hoạt tính Hoạt tính U/mg
Mẫu 1	aldB	0	16	0,423	37,8
Mẫu 2	aldB	0,25	121	0,423	286,1
Mẫu 3	aldB- T62A	0	3	0,244	12,3
Mẫu 4	aldB- T62A	0,25	137	0,244	561,5

Kết quả cho thấy rõ ràng việc khử muối các mẫu aldB làm giảm đáng kể hoạt tính đặc hiệu: 37,8 và 12,3 U/mg đối với aldB và aldB_T62A tương ứng. Khi ủ với thặng dư mol cao (> 8 lần) của ZnSO₄ trong 1 giờ ở nhiệt độ cao (55 C°), hoạt tính đặc hiệu tăng đáng kể đến 286,1 và 561,5 U/mg đối với aldB và aldB_T62A tương ứng. Sự tăng hoạt tính đặc hiệu của kẽm là cao nhất đối với aldB_T62A và hoạt tính đặc hiệu của aldB_T62A với kẽm cao hơn khoảng 1,9 lần so với mẫu aldB tương ứng. Do đó, với có mặt của thặng dư của đồng yếu tố hóa trị hai aldB_T62A cho thấy hoạt tính ALDC đặc hiệu tăng đáng kể so với aldB (kiểu đại).

Ví dụ 6

Hoạt tính đặc hiệu của biến thể aldb và aldb-t62a ở độ pH thấp

Các thể biến nạp *B. subtilis* có chứa cat-xet biểu hiện *aldB* và *aldB_T62A* được nuôi cấy dưới các điều kiện tương tự như được mô tả trong Ví dụ 1 và dịch nổi nuôi cấy được lọc vô trùng được phân tích đối với protein aldB và hoạt tính ALDC như được mô tả trong Ví dụ 2 và 3. Các mẫu được chuẩn hóa đến 127 U/mL với 50% (thể tích/thể tích) và nhiều ZnSO₄ khác nhau để thu được bổ sung 25 µM ZnSO₄ trong mẫu pha loãng. Các mẫu được pha loãng sau đó thành 10 U/mL trong chất đệm pH thấp với EDTA (50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05% Brij, 0,01% BSA, 10 µM EDTA) và được ủ bằng các tấm Costar 9017 trong máy PCR ở 50 °C. Hoạt tính ALDC được theo

đôi ở 0, 30, 60 và 90 phút ủ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 cùng với hoạt tính đặc hiệu được tính toán.

Bảng 4. Hoạt tính ALDC, nồng độ protein enzym và hoạt tính đặc hiệu của các mẫu aldB ở pH 4.0 và nhiệt độ cao (50 °C) là hàm thời gian.

			Tiêu chí	Hoạt tính
	Thời gian	Hoạt tính	Protein	Hoạt tính
	Phút	U/mL	mg/mL	U/mg
aldB	0	378,8	0,257	1476,2
aldB	30	380,2	0,257	1481,8
aldB	60	349,2	0,257	1360,9
aldB	90	275,4	0,257	1073,1
aldB-T62A	0	494,5	0,149	3316,1
aldB-T62A	30	494,1	0,149	3313,1
aldB-T62A	60	438,0	0,149	2937,1
aldB-T62A	90	357,1	0,149	2395,0

Kết quả cho thấy rõ ràng rằng aldB_T62A có hoạt tính đặc hiệu cao hơn đáng kể (3316,1 U/mg) so với các mẫu aldB (1476,2 U/mg) khi bắt đầu ủ pH thấp. Hoạt tính đặc hiệu của aldB_T62A cao gấp 2,2 lần aldB được chuẩn hóa bằng kẽm và glyxerol. Cả hai mẫu dần mất hoạt tính đặc hiệu khi ủ ở pH 4,0 (50 °C), tuy nhiên mức giảm tương đối tương tự đối với hai mẫu trong 90 phút ủ và khoảng 72% hoạt tính đặc hiệu được quan sát ban đầu.

Ví dụ 9

Giảm diaxetyl trong quá trình lên men bia bằng aldb và aldb-t62a

Mục tiêu của phân tích này là kiểm tra khả năng aldB và biến thể aldB-T62A (axetolactat decarboxylaza) làm giảm sự phát triển của diaxetyl trong quá trình lên men bia 7 ngày ở 14 °C.

Phân tích ủ mạch nha tinh khiết

1100 g chiết xuất mạch nha nhẹ của Munton (Mê XB 35189) được hòa tan trong 3000 mL nước máy ấm (45°C). Huyền phù đặc này được khuấy trong khoảng 10 phút cho đến khi chất lỏng đồng nhất và độ pH được điều chỉnh đến 5,2 bằng 2,5 M axit

sulphuric. Bổ sung 10 viên hoa bia đắng từ Hopfenveredlung, St. Johann: Hàm lượng alpha bằng 16,0 % (phân tích HPLC đặc hiệu EBC 7.7 0, 01.10.2013), sau đó chia vào chai nắp xanh dung tích 500mL và đun sôi trong 1 giờ để đảm bảo sự kết tủa protein và tránh được khả năng nhiễm khuẩn. Chiết xuất mạch nha đã lọc (hèm rượu) được lấy mẫu để xác định trọng lượng riêng và Nitơ amino tự do (FAN). Hèm rượu cuối cùng có trọng lượng riêng ban đầu bằng 1048 (12 °Plato). Hèm rượu lọc (200 g) được thêm vào bình hình nón thể tích 500-mL (Fermenting Vessel; FV), và sau đó được làm nguội đến 13 °C. Mỗi bình hình nón được thêm 0,5% W34/70 (Weiherstephan) nấm men mới sản xuất (1,0 g nấm men mỗi 200 g hèm rượu). Các enzym được định liều dựa trên hoạt tính ALDC tương tự (0,03 U/ml hèm rượu, 8 đơn vị ALDC cho mỗi 200 g hèm rượu). Bình lên men đối chứng không có enzym nhận được lượng nước khử ion tương ứng với lượng mẫu enzym.

Các mẫu hèm rượu được lên men trong bình hình nón dung tích 500 mL trong các điều kiện thử nghiệm phòng thí nghiệm đã được chuẩn hóa ở nhiệt độ 14 °C có khuấy nhẹ ở 150 rpm trong thiết bị ủ orbitan. Khi tổn hao khối lượng ít hơn 0,25 g trong 24 giờ, nhiệt độ lên men được làm giảm xuống 7 °C. Kết thúc lên men sau tổng cộng 7 ngày. Các mẫu (10 mL) được lấy ra để phân tích diacetyl hai lần một ngày, tốt hơn là cách nhau từ 11 đến 14 giờ giữa các lần; tại thời điểm cuối của quá trình lên men chỉ lấy 1 mẫu một ngày. Nấm men được để lắng trước khi lấy ra và mỗi mẫu được làm lạnh ở 10 °C trong 10 phút và sau đó được ly tâm ở 4000 rpm trong 10 phút ở 8 °C để lắng cặn nấm men dư bất kỳ. Dịch nổi bề mặt được tách khỏi phần lắng cặn nấm men và các mẫu cho phân tích GC được bổ sung 0,5 g NaCl cho mỗi mL mẫu. Bột nhào được chuyển đến lọ có bộ phận hóa hơi và được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 65 °C trong 30 phút trước khi tiến hành phân tích diacetyl và 2,3-pentandion bằng sắc ký khí với sự dò khối phổ (GCMS).

Các phân tích diacetyl và 2,3-pentandion được tiến hành tại Agilent 6890N/5973N GC với thiết bị lấy mẫu tự động có bộ phận hóa hơi CombiPAL và phần mềm thu nhận và phân tích MS ChemStation. Các mẫu được làm cân bằng ở nhiệt độ 70 °C trong 10 phút trước khi bơm 500 µl pha khí ở trên mẫu lên trên cột J&W 122-0763 DB-1701 (60 m x 0,25 mm ID x 1 µm). Nhiệt độ bơm là 260°C và hệ được vận hành ở tốc độ dòng heli không đổi bằng 2 mL/phút. Nhiệt độ dò là: 50 °C (2 phút), 160 °C (20 °C/phút), 220 °C (40 °C/phút), giữ trong 2 phút. Phép dò MS được thực hiện với 500 µl

với tỷ lệ chia tách 5:1 ở các ion đã được chọn. Tất cả các mẫu đều được chạy trong hai bản sao và các mẫu chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng nước máy có bổ sung diaxetyl hoặc 2,3-pentandion.

Nồng độ của hợp chất được tính toán dưới dạng

$$\text{Hợp chất (mg/L)} = \text{RF} \times \frac{\text{Diện tích}}{1000 \times W_s}$$

trong đó,

RF là hệ số đáp ứng của axit axetic

Diện tích là diện tích GC của axit axetic

W_s là lượng mẫu được sử dụng (tính bằng ml)

Giới hạn định lượng diaxetyl được xác định là 0,016 mg/l và giới hạn định lượng 2,3-pentandion được xác định là 0,012 mg/l.

Để kiểm tra rằng việc bổ sung polypeptit tái tổ hợp không ảnh hưởng đến Mức độ lên men thực (RDF) và rượu được sản xuất ra theo thể tích: RDF được xác định bằng cách sử dụng Anton Paar (DMA 5000) tuân theo quá trình ủ theo hướng dẫn chuẩn, 23.8580-B28 và rượu theo quá trình ủ theo hướng dẫn chuẩn, 23.8580-B28.

Kết quả từ phân tích mẫu hèm rượu được sử dụng cho tất cả các mẫu lên men.

Loại mẫu	Chiết xuất (°P)	Độ nhớt ở 12 °P (mPa·s)	FAN (mg/L)
Hèm rượu = Chiết xuất mạch nha	12,14	1,623	219

Khả năng làm giảm sự phát triển của VDK trong quá trình lên men 7 ngày ở 14 °C đã được nghiên cứu bằng cách thêm aldB và aldB-T62A xem Bảng 5.

Bảng 5. Hoạt tính ALDC, nồng độ protein enzym và nồng độ enzym được tính toán trong hèm rượu

Hoạt tính ALDC	Số lượng mẫu trước pha loãng	Thể tích trước pha loãng	Hoạt tính trong hèm rượu	Protein ALDC trong hèm rượu
----------------	------------------------------	--------------------------	--------------------------	-----------------------------

	U/g	g	mL	U/mL	µg/L
aldB	460	3,78	100	0,03	75,6
aldB-T62A	374	4,65	100	0,03	48,1

Cả aldB và aldB-T62A đều làm giảm diketon lân cận (VDK) trong quá trình lên men so với đối chứng. Quan trọng nhất là thời gian lên men cần để đạt mức ngưỡng 0,1 mg/mL VDK (tổng cộng diacetyl và 2,3-pentadion) hoặc thấp hơn, được quan sát là khoảng 116 giờ đối với aldB và aldB-T62A trong khi đó là 140 đối với đối chứng. Do đó, aldB-T62A hoạt tính đặc hiệu cao hơn cho phép giảm VDK so sánh được bằng cách sử dụng ít protein ALDC hơn. Tổng hàm lượng VDK khi kết thúc quá trình lên men được nêu trong Bảng 6.

Bảng 6. Tổng VDK tính bằng mg/L sau 97, 116 và 140 giờ lên men với sự bao gồm aldB, aldB-T62A hoặc không có đối chứng enzym.

	Diketon lân cận (VDK) mg/L		
	Thời gian: 97 giờ	Thời gian: 116 giờ	Thời gian 140 giờ
Đối chứng	0,245	0,112	0,078
AldB	0,148	0,070	0,078
AldB-762A	0,134	0,071	0,063

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) bao gồm

(i) ít nhất 80% axit amin đồng nhất với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, trong đó polypeptit bao gồm ít nhất sự thay thế axit amin ở vị trí 62 theo đánh số vị trí của trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và trong đó hoặc polypeptit có hoạt tính đặc hiệu ALDC tăng ít nhất là 1,1 lần so với hoạt tính của trình tự kiểu đại (SEQ ID NO: 3) trong các điều kiện về cơ bản tương tự nhau; hoặc

(ii) mảnh chức năng của (i) có hoạt tính đặc hiệu lớn hơn hoặc bằng hoạt tính đặc hiệu của (i).

2. Polypeptit tái tổ hợp theo điểm 1 có ít nhất 90% axit amin đồng nhất với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3

3. Polypeptit tái tổ hợp theo điểm 2 trong đó sự thay thế axit amin là T62A.

4. Polypeptit tái tổ hợp theo điểm 3 có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8.

5. Chế phẩm bao gồm polypeptit tái tổ hợp theo điểm 1, điểm 2, điểm 3 hoặc điểm 4 và kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM.

6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 μ M đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μ M đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μ M đến khoảng 50 μ M, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μ M đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

7. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với polypeptit tái tổ hợp là

(i) lớn hơn 1; hoặc

(ii) 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc

- (iii) 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc
- (iv) 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc
- (v) 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc
- (vi) 60:1 hoặc lớn hơn.

8. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza được xử lý bằng glutaraldehyt.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza được xử lý bằng glutaraldehyt là ở nồng độ tương ứng với khoảng từ khoảng 0,1 gam đến khoảng 5 gam glutaraldehyt mỗi gam polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza.

10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 9, trong đó hoạt tính của polypeptit tái tổ hợp này có hoạt tính axetolactat decarboxylaza nằm trong khoảng từ 950 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10, còn bao gồm ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, xylan axetyl esteraza, và proteaza.

12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 11, trong đó polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza có nguồn gốc từ axetolactat decarboxylaza từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

13. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của polypeptit tái tổ hợp theo điểm 1 hoặc điểm 2 trong phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào chế phẩm bao gồm polypeptit tái tổ hợp sao cho kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μ M đến khoảng 5 mM.

15. Môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm chế phẩm bao gồm

i) polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) theo điểm 1, điểm 2, điểm 3 hoặc điểm 4, và;

ii) kẽm; trong đó chế phẩm này bao gồm kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μ M đến khoảng 200 mM.

16. Môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín bia theo điểm 15, trong đó hoạt tính của polypeptit tái tổ hợp này có hoạt tính axetolactat decarboxylaza nằm trong khoảng từ 1000 đến 3500 đơn vị cho mỗi mg protein.

17. Môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê theo điểm 16, còn bao gồm ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixelulaza, xelulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hiệp lực thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hiệp lực xylanaza như arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza, và proteaza.

18. Phương pháp để sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê bao gồm việc bổ sung chế phẩm bao gồm polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza (ALDC) theo điểm 1, điểm 2, điểm 3 hoặc điểm 4 và kẽm vào môi trường thích hợp để sản xuất bia, rượu vang, rượu táo, rượu lê hoặc rượu xa-kê.

19. Phương pháp theo điểm 18 trong đó

(i) kẽm có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM; hoặc

(ii) tỷ lệ mol của kẽm so với polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính axetolactat decarboxylaza trong chế phẩm cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

Fig. 1

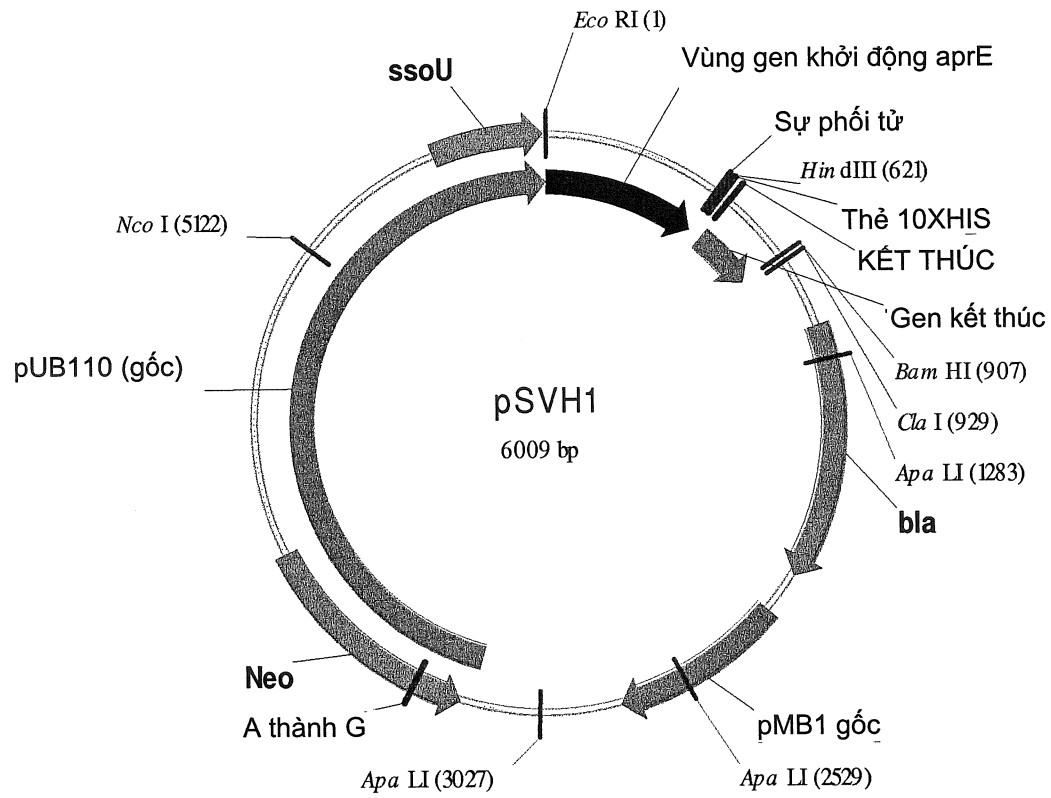
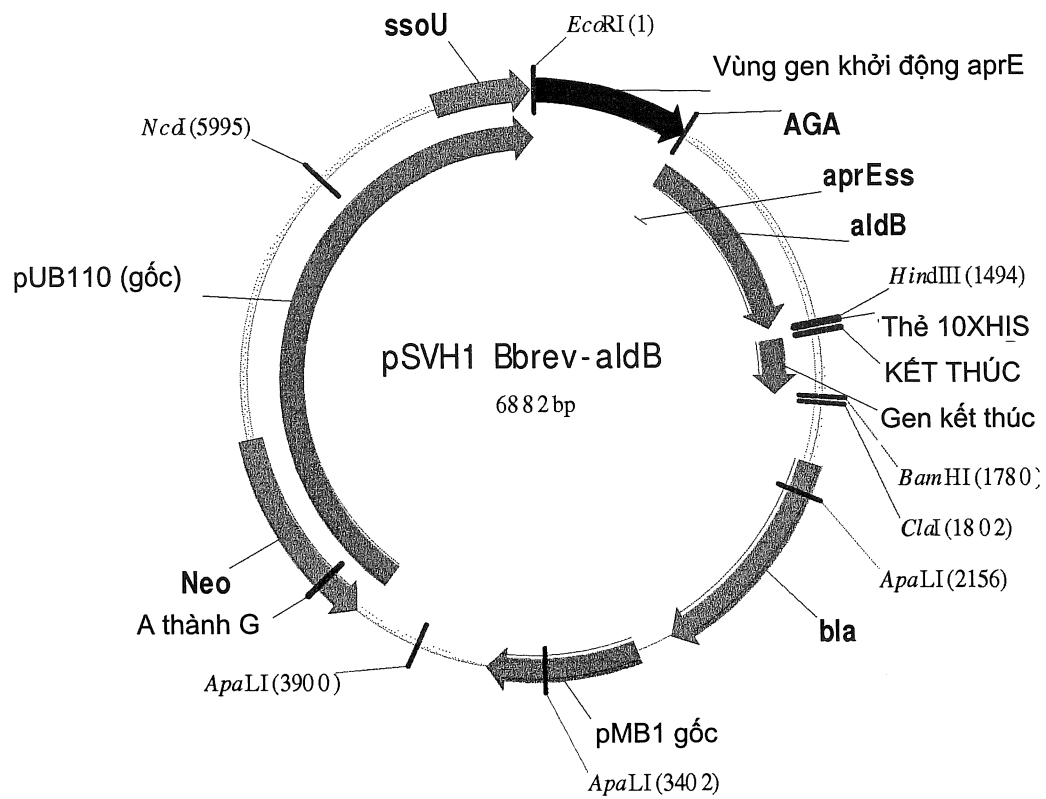


Fig. 2



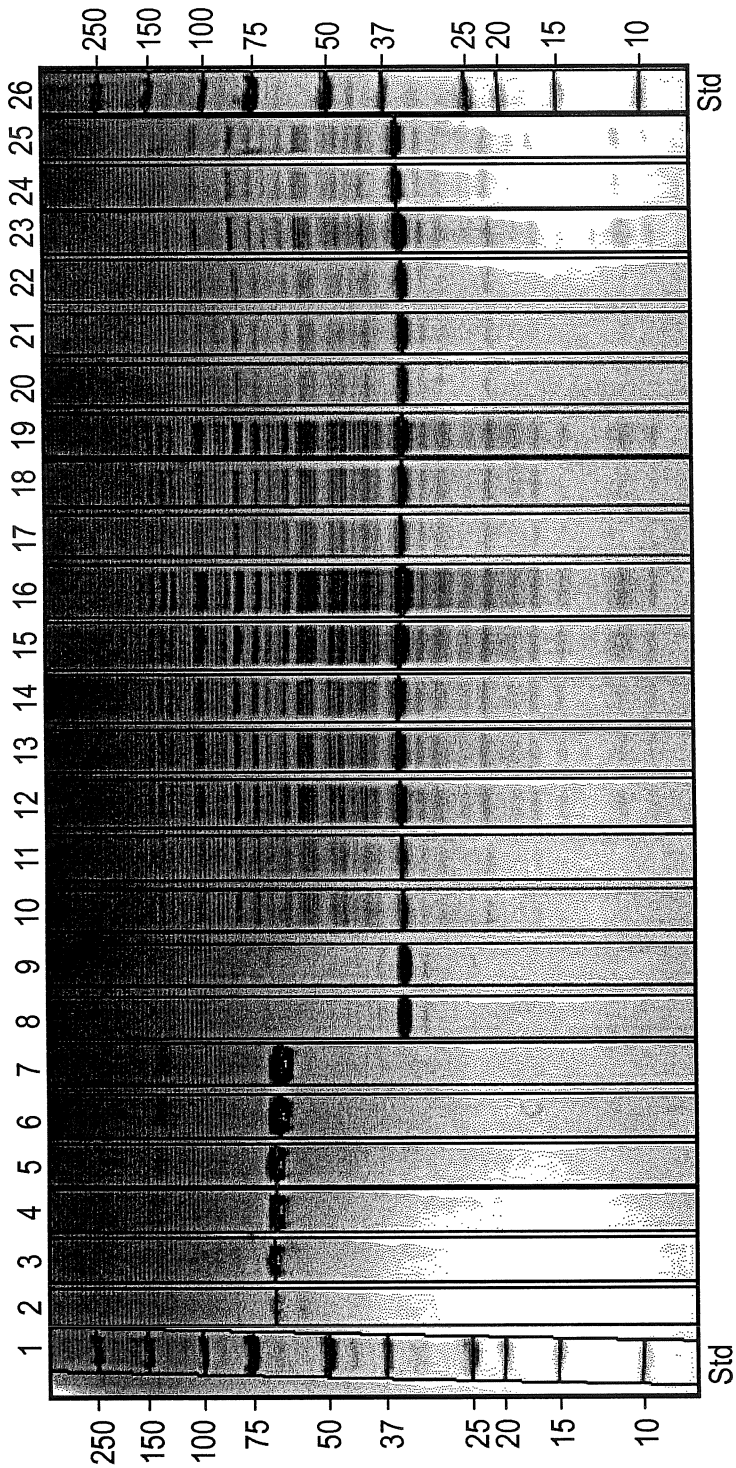


FIG. 3

TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
 CRAMER, JACOB FLYVOLM
 JENSEN, LENE BOJSEN

<120> POLYPEPTIT TÁI TỔ HỢP CÓ HOẠT TÍNH AXETOLACTAT DECARBOXYLAZA (ALDC),
 CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG HOẠT TÍNH VÀ/HOẶC ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA POLYPEPTIT
 NÀY

<130> NB41154USPSP

<160> 8

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Brevibacillus brevis

<400> 1
 atgaaaaaaa atatcatcac ttctatcaca tctctggctc tggttgccgg gctgtctttg 60
 actgcttttg cagctacaac ggctactgta ccagcaccac ctgccaagca ggaatccaaa 120
 cctgcgggttg ccgctaatacc ggcacaaaaa aatgtactgt ttcaatactc aacgatcaat 180
 gcactcatgc ttggacagtt tgaaggggac ttgactttga aagacctgaa gctgcgaggc 240
 gatatggggc ttggtaccat caatgatctc gatggagaga tgattcagat gggtaaaaaa 300
 ttctaccaga tcgacagcac cggaaaatta tcggagctgc cagaaagtgt gaaaactcca 360
 tttgcgggta ctacacatct cgagccgaaa gaaaaaacta cattaaccaa tgtgcaagat 420
 tacaatcaat taacaaaaat gcttgaggag aaatttgaaa acaagaacgt cttttatgcc 480
 gtaaagctga ccggtacctt taagatggta aaggctagaa cagttccaaa acaaaccaga 540
 cttatccgc agctgactga agtaacaaa aaacaatccg agtttgaatt taaaaatgtt 600
 aagggaaccc tgattggctt ctatacgcca aattatgcag cagccctgaa tgttcccgga 660
 ttccatctcc acttcatcac agaggataaa acaagtggcg gacacgtatt aaatctgcaa 720
 tttgacaacg cgaatctgga aatttctccg atccatgagt ttgatgtaca attgccgcac 780
 acagatgatt ttgcccactc tgatctgaca caagttacta ctagccaagt acaccaagct 840
 ggtcagaaa gaaaataa 858

<210> 2
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Brevibacillus brevis

<400> 2

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

Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala
 20 25 30

Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala
 35 40 45

Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu
 50 55 60

Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly
 65 70 75 80

Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln
 85 90 95

Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu
 100 105 110

Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu
 115 120 125

Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu
 130 135 140

Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro
 165 170 175

Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln
 180 185 190

Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr
 195 200 205

Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu His
 210 215 220

Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln
 225 230 235 240

Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val
 245 250 255

Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys
 275 280 285

<210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Brevibacillus brevis

<400> 3

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45

Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe
 115 120 125

Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys
 130 135 140

Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val
 165 170 175

Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu
 180 185 190

Asn Val Pro Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser
 195 200 205

Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile
 210 215 220

Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe
 225 230 235 240

Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala
 245 250 255

Glu Ser Glu Arg Lys
 260

<210> 4
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4
 gctacaacgg ctactgtacc agcaccacct gccaaagcagg aatccaaacc tgcggttgcc 60
 gctaataccgg caccaaaaaa tgtactgttt caatactcaa cgatcaatgc actcatgctt 120
 ggacagtttg aaggggactt gactttgaaa gacctgaagc tgcgaggcga tatggggctt 180
 ggtaccatca atgatctcga tggagagatg attcagatgg gtacaaaatt ctaccagatc 240
 gacagcaccg gaaaattatc ggagctgcc aagagtgtga aaactccatt tgcggttact 300
 acacatttcg agccgaaaga aaaaactaca ttaaccaatg tgcaagatta caatcaatta 360
 acaaaaatgc ttgaggagaa atttgaaaac aagaacgtct tttatgccgt aaagctgacc 420
 ggtactttta agatggtaaa ggctagaaca gttccaaaac aaaccagacc ttatccgcag 480
 ctgactgaag taaccaaaaa acaatccgag tttgaattta aaaatgttaa gggaaccctg 540
 attggcttct atacgccaaa ttatgcagca gccctgaatg ttcccgatt ccatctccac 600
 ttcatcacag aggataaaac aagtggcgga cacgtattaa atctgcaatt tgacaacgcg 660
 aatctggaaa tttctccgat ccatgagttt gatgttcaat tgccgcacac agatgatttt 720
 gccactctg atctgacaca agttactact agccaagtac accaagctga gtcagaaaga 780
 aaa 783

<210> 5
 <211> 290
 <212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Thr Thr
20 25 30

Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val
35 40 45

Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile
50 55 60

Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp
65 70 75 80

Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp
85 90 95

Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr
100 105 110

Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val
115 120 125

Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln
130 135 140

Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys
145 150 155 160

Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys
165 170 175

Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu
180 185 190

Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr
195 200 205

Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro
210 215 220

Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His
225 230 235 240

Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile
245 250 255

His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser
260 265 270

Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu
275 280 285

Arg Lys
290

<210> 6
<211> 873
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6
gtgagaagca aaaaattgtg gatcagcttg ttgtttgcgt taacgttaat ctttacgatg 60
gcgttcagca acatgagcgc gcaggctgct acaacggcta ctgtaccagc accacctgcc 120
aagcaggaat ccaaacctgc ggttgccgct aatccggcac caaaaaatgt actgtttcaa 180
tactcaacga tcaatgcact catgcttggc cagtttgaag gggacttgac tttgaaagac 240
ctgaagctgc gaggcgatat ggggcttggc gcaatcaatg atctcgatgg agagatgatt 300
cagatgggta caaaattcta ccagatcgac agcaccggaa aattatcgga gctgccagaa 360
agtgtgaaaa ctccatttgc gggtactaca catttcgagc cgaaagaaaa aactacatta 420
accaatgtgc aagattacaa tcaattaaca aaaatgcttg aggagaaatt tgaaaacaag 480
aacgtctttt atgccgtaaa gctgaccggt acttttaaga tggtaaaggc tagaacagtt 540
ccaaaacaaa ccagacctta tccgcagctg actgaagtaa caaaaaaca atccgagttt 600
gaatttaaaa atgttaaggg aaccctgatt ggcttctata cgccaaatta tgcagcagcc 660
ctgaatgttc ccggattcca tctccacttc atcacagagg ataaaacaag tggcggacac 720
gtattaaatc tgcaatttga caacgcgaat ctggaaattt ctccgatcca tgagtttgat 780
gttcaattgc cgcacacaga tgattttgcc cactctgatc tgacacaagt tactactagc 840
caagtacacc aagctgagtc agaaagaaaa taa 873

<210> 7

<211> 290
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Thr Thr
 20 25 30

Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val
 35 40 45

Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile
 50 55 60

Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Ala Ile Asn Asp Leu Asp
 85 90 95

Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr
 100 105 110

Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val
 115 120 125

Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln
 130 135 140

Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys
 145 150 155 160

Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys
 165 170 175

Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu
 180 185 190

Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr
 195 200 205

Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro

210

215

220

Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His
 225 230 235 240

Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile
 245 250 255

His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser
 260 265 270

Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu
 275 280 285

Arg Lys
 290

<210> 8
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45

Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Ala Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe

115					120					125						
Glu	Asn	Lys	Asn	Val	Phe	Tyr	Ala	Val	Lys	Leu	Thr	Gly	Thr	Phe	Lys	
130					135					140						
Met	Val	Lys	Ala	Arg	Thr	Val	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg	Pro	Tyr	Pro	Gln	
145					150					155					160	
Leu	Thr	Glu	Val	Thr	Lys	Lys	Gln	Ser	Glu	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Val	
165					170					175						
Lys	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Ala	Leu	
180					185					190						
Asn	Val	Pro	Gly	Phe	His	Leu	His	Phe	Ile	Thr	Glu	Asp	Lys	Thr	Ser	
195					200					205						
Gly	Gly	His	Val	Leu	Asn	Leu	Gln	Phe	Asp	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Ile	
210					215					220						
Ser	Pro	Ile	His	Glu	Phe	Asp	Val	Gln	Leu	Pro	His	Thr	Asp	Asp	Phe	
225					230					235					240	
Ala	His	Ser	Asp	Leu	Thr	Gln	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Val	His	Gln	Ala	
245					250					255						
Glu	Ser	Glu	Arg	Lys												
260																