



(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) 
1-0020641

(51)⁷ **C12N 15/00, 1/20, C11D 9/42, C07K 1/00, (13) B**
C07H 21/04

-
- | | |
|--|-------------------------------|
| (21) 1-2011-01994 | (22) 28.12.2009 |
| (86) PCT/FI2009/051043 28.12.2009 | (87) WO2010/076388 08.07.2010 |
| (30) 20086253 30.12.2008 FI | |
| (45) 25.03.2019 372 | (43) 25.10.2011 283 |
| (73) AB ENZYMES OY (FI)
Tykkimöentie 15, FI-05200 Rajamäki, Finland | |
| (72) VALTAKARI Leena (FI), ALAPURANEN Marika (FI), SZAKACS George (HU),
KALLIO Jarno (FI), OJAPALO Pentti (FI), VEHEMAANPERA Jari (FI), PURANEN
Terhi (FI) | |
| (74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | |
-

(54) **POLYPEPTIT ENDOGLUCANAZA CỦA NẤM, CHẾ PHẨM ENZYM, PHƯƠNG
PHÁP SẢN XUẤT VÀ QUY TRÌNH XỬ LÝ VẬT LIỆU XENLULOZA**

(57) Sáng chế đề cập đến endoglucanaza từ nấm thể hiện hoạt tính đáng kể ở nhiệt độ thấp. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất endoglucanaza, thuận lợi nếu endoglucanaza được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Endoglucanaza được dùng để xử lý vật liệu xenluloza, đặc biệt là trong công nghiệp dệt, ví dụ trong xử lý hoàn thiện sinh học hoặc mài mòn sinh học. Endoglucanaza cũng có thể được sử dụng trong chất tẩy rửa, trong thức ăn và/hoặc trong công nghiệp giấy và bột giấy hoặc sản xuất etanol sinh học.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến endoglucanaza của nấm, sản phẩm chứa chúng và phương pháp sản xuất chúng. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm enzyme chứa ít nhất một endoglucanaza mới này, cũng như đến quy trình xử lý vật liệu xenluloza bằng cách sử dụng chế phẩm này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm tẩy rửa và thức ăn chứa endoglucanaza này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Xenulaza nằm trong số các enzyme được sử dụng rộng rãi nhất trong công nghiệp. Chúng thường được sử dụng trong công nghiệp dệt may, công nghiệp tẩy rửa, công nghiệp giấy và bột giấy công nghiệp, công nghiệp thức ăn và thực phẩm, bao gồm cả thực phẩm nướng, và trong việc thủy phân vật liệu lignoxenluloza, ví dụ, để sản xuất etanol sinh học v.v.. Việc sử dụng thực tế của xenulaza bị cản trở bởi bản chất của các thành phần xenulaza, thường là hỗn hợp enzyme có nhiều hoạt tính và tính đặc hiệu chất nền khác nhau. Vì lý do này, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để có được các xenulaza chỉ có các hoạt tính mong muốn. Các đặc tính độc đáo của mỗi xenulaza khiến cho một số xenulaza thích hợp hơn trong một số ứng dụng so với các xenulaza khác.

Trong xử lý vải, xenulaza tác dụng lên các mạch phân tử xenluloza trong các sợi bông, vì thế làm ảnh hưởng đến các đặc tính của vải.

Trong công nghiệp dệt may, những năm gần đây, kiểu mài hoặc “giặt bằng đá” đã được sự quan tâm của các nhà sản xuất vải bông chéo. Việc giặt truyền thống bằng đá bọt làm giảm độ bền của vải và tạo thêm khó khăn cho các thiết bị giặt là. Có xu hướng sử dụng quy trình xử lý hoàn thiện vải bông chéo bằng enzyme và xenulaza thay cho hoặc kết hợp với đá bọt để tạo cho vải có kiểu “mài” mong muốn. Việc xử lý bằng enzyme có kiểm soát gây ít tổn hại hơn cho các sản phẩm dệt may, máy móc và loại bỏ được công đoạn loại bỏ đá sau khi xử lý.

Ngoài ra, công nghiệp dệt sử dụng xenlulaza trong xử lý hoàn thiện sinh học, tức là để cải thiện lâu dài khả năng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn, và để cải thiện khả năng chống nổi hạt xoắn, cấu trúc bề mặt rõ ràng bởi giảm được hiện tượng xù xơ, cải thiện khả năng xử lý hàng dệt may, như tạo cảm giác mềm, trơn và mượt, cải thiện khả năng xếp nếp và vải có màu sáng hơn và cải thiện khả năng hấp thụ hơi ẩm.

Xenlulaza bao gồm miền/nhân xúc tác (catalytic domain - CD) biểu hiện hoạt tính xenlulaza. Ngoài miền xúc tác này, phân tử xenlulaza có thể bao gồm một hoặc nhiều miền gắn kết xenluloza (cellulose binding domains - CBD), còn được gọi là miền/môđun gắn kết hydrat cacbon (carbohydrate binding domains - CBD/carbohydrate binding modules - CBM), có thể nằm ở đầu N hoặc đầu C của miền xúc tác. Các CBD có hoạt tính gắn kết hydrat cacbon và chúng tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của enzym trên các nền mang rắn. Nhân xúc tác và CBD thường được nối với nhau thông qua vùng liên kết linh hoạt và được glycosyl hoá ở mức cao.

Các xenlulaza có tác dụng chủ yếu trên bề mặt của sợi là đặc biệt hữu ích trong việc giặt bằng đá vải bông chéo được nhuộm thuốc nhuộm Indigo, khi thuốc nhuộm này nằm trên bề mặt của sợi. Xenlulaza được dùng trong xử lý vải bông chéo thường được chia thành hai nhóm chính: xenlulaza axit và xenlulaza trung tính. Xenlulaza axit thường hoạt động ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5 còn xenlulaza trung tính thường hoạt động ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8. Đặc biệt là, xenlulaza axit được sử dụng trong xử lý hoàn thiện sinh học (loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn) và cả trong xử lý vải bông chéo (mài mòn sinh học) trong khi xenlulaza trung tính thường được sử dụng trong xử lý vải bông chéo.

Endoglucanaza (EG) là một trong ba loại xenlulaza cần thiết cho phản ứng chuyển hóa sinh học xenluloza thành glucoza. Một số endoglucanaza có trong tự nhiên có miền gắn kết xenluloza (CBD), trong khi một số khác thì lại không có miền này. Endoglucanaza được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp dệt may, chất tẩy rửa, etanol sinh học và công nghiệp giấy và bột giấy.

Xenlulaza, bao gồm endoglucanaza có thể được phân loại thành các họ glycosyl hydrolaza khác nhau theo trình tự chính của chúng, dựa trên kết quả phân tích cấu trúc không gian ba chiều của một số thành viên trong họ (Henrissat 1991, Henrissat and Bairoch 1993, 1996). Ví dụ, các họ glycosyl hydrolaza 5, 7, 12 và 45 chứa endoglu-

canaza. Trong lĩnh vực dệt may, hầu hết các xenlulaza axit thuộc họ 5, trong khi hầu hết xenlulaza trung tính thuộc họ 12 hoặc 45.

Việc sử dụng rộng rãi endoglucanaza trong công nghiệp đã tạo ra nhu cầu về sản phẩm endoglucanaza thương mại có tính năng mong muốn ở các điều kiện như các khoảng pH và nhiệt độ mong muốn.

Phần lớn các enzym được sử dụng trong công nghiệp làm việc tốt hơn ở nhiệt độ cao, thường khoảng $>50^{\circ}\text{C}$, nhưng vì lý do tiết kiệm năng lượng, độ bền màu cao hơn và giảm độ co ngót của các sản phẩm dệt may, nên lại cần có các enzym có tính năng tốt ở các mức nhiệt độ thấp hơn, tức là $<50^{\circ}\text{C}$, ví dụ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C , hoặc ngay cả ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C . Các enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp như vậy đã được tìm thấy, ví dụ trong vi khuẩn, đặc biệt là trong *Bacillus*. Tuy nhiên, việc sản xuất các enzym vi khuẩn cho các ứng dụng công nghiệp là rất phức tạp và mất thời gian so với việc sản xuất các enzym nấm. Hiện vẫn có rất ít kiến thức về endoglucanaza của nấm hoạt động ở nhiệt độ thấp này.

Theo hiểu biết của các tác giả sáng chế, thì cho đến nay vẫn chưa một endoglucanaza hoạt động ở nhiệt độ thấp nào được bộc lộ.

Endoglucanaza thuộc họ Cel45 đã được mô tả trong US 5,610,129, tài liệu này mô tả các chế phẩm ức chế sự thôi màu của thuốc nhuộm chứa xenlulaza *Humicola insolens* kd43. Tuy nhiên tài liệu này không mô tả các đặc tính nhiệt của nó.

Enzym *Gibberella zeae* Cel45 vẫn chưa được đề xuất sử dụng trong xử lý hoàn thiện sản phẩm dệt may.

US 7,256,032 mô tả xenlulaza Cel45 có tính năng tốt trong xử lý hoàn thiện sản phẩm dệt may. Tính năng trong xử lý hoàn thiện vải bông chéo là tối ưu ở nhiệt độ 60°C , và nhiệt độ thấp nhất được đo là 40°C với hoạt tính tối ưu nhỏ hơn 50%.

US2005/070003 mô tả các chế phẩm xenlulaza sử dụng tốt, ví dụ trong các chế phẩm giặt là, đánh bóng sinh học các hàng dệt may mới được sản xuất và tạo ra kiểu mài cho vải xenluloza. Không một enzym nào trong số các enzym đã được mô tả này cho thấy tính năng có lợi ở nhiệt độ thấp.

Do vậy, vẫn luôn có nhu cầu về xenlulaza mới có các đặc tính và profin nhiệt mong muốn. Sáng chế đáp ứng được nhu cầu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất endoglucanaza mới thuộc họ cel45, có đặc tính nhiệt độ dẻo vì có tính năng tốt cả ở nhiệt độ thấp. Đặc tính nhiệt độ dẻo này có nghĩa là không có sự giảm đáng kể về tính năng có thể thấy được khi nhiệt độ dưới 50°C, ví dụ khoảng 40°C, khoảng 30°C hoặc ngay cả khoảng 20°C.

Endoglucanaza có thể được sử dụng trong các ứng dụng xenlulaza khác nhau như xử lý vải, đặc biệt là xử lý vải bông chéo và loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn. Trái với các enzym loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn đã được mô tả trước đây, nói chung chúng là xenlulaza axit, endoglucanaza mới này cũng có tác dụng tốt ở độ pH tương đối trung tính. Điều này cho phép xử lý hoàn thiện sinh học đồng thời với việc nhuộm, dẫn đến việc tiết kiệm đáng kể. Ngoài ra, độ bền màu thường tốt hơn ở các điều kiện trung tính.

Sáng chế đề xuất polypeptit endoglucanaza của nấm, thuộc họ glycosyl hydrolaza 45, và có tính năng mỹ mẫn ở nhiệt độ thấp. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm enzym chứa endoglucanaza này, và chế phẩm tẩy rửa và thức ăn chứa enzym hoặc chế phẩm enzym này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến endoglucanaza bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 65% so với SEQ ID NO: 13, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 48% so với SEQ ID NO: 15, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 87% so với SEQ ID NO: 17, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 62% so với SEQ ID NO: 19, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 59% so với SEQ ID NO: 21 hoặc có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 49% so với SEQ ID NO: 23, hoặc đoạn có hoạt tính enzym của endoglucanaza này.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập được chọn từ nhóm bao gồm:

a) trình tự nucleotit có SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20 hoặc 22, hoặc trình tự mã hóa polypeptit endoglucanaza nêu trên,

b) sợi bổ trợ của a); hoặc

c) trình tự thoái hóa do mã di truyền thành trình tự bất kỳ trong số các trình tự a) hoặc b).

Sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện bao gồm polynucleotit nêu trên, tế bào chủ bao gồm vector biểu hiện này, và chủng *E. coli* có số nộp lưu DSM 18916, DSM 19171, DSM 19173, DSM 18915, DSM 18917, hoặc DSM 19170.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit endoglucanaza, bao gồm các bước: biến nạp tế bào chủ với vector biểu hiện mã hóa polypeptit nêu trên, và nuôi cấy tế bào chủ này trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit này, và tùy ý thu hồi và tinh chế polypeptit này.

Cuối cùng, sáng chế đề xuất quy trình xử lý vật liệu xenluloza, trong đó quy trình này bao gồm bước cho vật liệu xenluloza tiếp xúc với polypeptit endoglucanaza hoặc chế phẩm enzym theo sáng chế.

Các phương án cụ thể của sáng chế được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc. Các đối tượng, chi tiết và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên dễ hiểu hơn qua phần mô tả các hình vẽ, phần mô tả chi tiết và các ví dụ sau. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các phương án được nêu trong bản mô tả, các hình vẽ và các ví dụ chỉ dùng chỉ để minh họa, và các thay đổi và các cải biến khác nhau đều có thể nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện các băng biểu hiện được sử dụng trong biến nạp các tế bào trần *Trichoderma reesei* để sản sinh dư thừa protein Cel45 tái tổ hợp.

Fig.1 thể hiện khoảng pH tối ưu của các chế phẩm protein Cel45A tái tổ hợp, và Fig.2B thể hiện khoảng ổn định nhiệt của các chế phẩm protein Cel45A tái tổ hợp.

Các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3E thể hiện profin nhiệt độ của các chế phẩm Cel45 mới so với các chế phẩm Cel45 thương phẩm trong xử lý vải bông chéo.

Các hình vẽ từ Fig.4A đến Fig.4B thể hiện tính năng của các chế phẩm Cel45 mới ở các độ pH khác nhau trong xử lý vải bông chéo.

Fig.5 thể hiện tác dụng của *Gp_RF6293_Cel45* trong xử lý hoàn thiện sinh học (loại bỏ xơ xù) ở nhiệt độ 40°C so với mẫu đối chứng không có enzym.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa trên các nghiên cứu, trong đó tập hợp các giống cây của nấm được sàng lọc để có hoạt tính thủy phân xenlulô ở nhiệt độ thấp. Các giống nấm được nuôi cấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian từ 3 đến 7 ngày bằng cách sử dụng các môi trường sinh sản khác nhau. Dịch nổi bề mặt được thu hồi và hoạt tính thủy phân xenlulô của carboxymethylxenluloza (CMC) và hydroxyethylxenlulaza (HEC) ở nhiệt độ 30°C và 50°C được thử nghiệm để sàng lọc profin nhiệt độ thấp. Các giống có đặc tính tốt nhất còn được thử nghiệm trong xử lý mài mòn sinh học trên quy mô nhỏ sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian từ 4 đến 7 ngày. Sau khi sàng lọc sơ bộ 4 giống được chọn để xây dựng các thư viện gen, và các thư viện này được sàng lọc tiếp đối với các gen *cel45* bằng các mẫu lai thử được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi thoái hóa. Các dòng thể thực khuẩn dương tính được tách dòng phụ thành các vector vi khuẩn và được xác định bằng trình tự trước khi nộp lưu tại DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Để sản xuất các enzym Cel45, các gen mã hóa các hoạt tính mong muốn được dung hợp thành gen khởi đầu *Trichoderma reesei* cbh1/cel7. Sự kết thúc phiên mã được đảm bảo bởi gen kết thúc *T. reesei* cbh1/cel7A, và gen đánh dấu amdS được sử dụng để sàng lọc các dòng vô tính dương tính. Các băng biểu hiện tuyến tính được phân lập từ mạch chính vector và được biến nạp vào các tế bào trần *T. reesei* đã được loại bỏ các xenlulaza chính. Các thể biến nạp đã tinh chế được nuôi cấy trong thời gian 7 ngày trong môi trường cảm ứng xenlulaza và hoạt tính endoglucanaza được thử nghiệm bằng cách sử dụng dịch nổi bề mặt nuôi cấy. Các đặc tính nhiệt và độ pH cũng được thử nghiệm. Vật liệu để áp dụng trên quy mô lớn thu được bằng cách nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 28°C trong thời gian từ 3 đến 4, ngày tiếp đó là lọc và cô, nếu cần.

Dịch nổi bề mặt nuôi cấy được thử nghiệm trong xử lý vải bông chéo ở các nhiệt độ khác nhau, sử dụng chế phẩm so sánh là hai chế phẩm Cel45 loại thương phẩm trong thiết bị giặt. Hiệu quả mài mòn sinh học thu được được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp đo màu phản xạ (color reflectance measurement). Đáng ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các profin nhiệt độ đo được khác với các profin nhiệt độ nhận được với sự khác biệt cơ bản trong ống thử nghiệm. Ngoài ra, các

đặc tính độ pH của các mẫu được thử nghiệm trong thử nghiệm vải bông chéo. Ngoài ra, tác dụng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ xơ xù đối với vải nỉ dạng sợi bông được thử nghiệm trong thiết bị giặt với các lượng enzym khác nhau và được so sánh với mẫu của tình trạng kỹ thuật. Đáng ngạc nhiên là, ở nhiệt độ thấp, bề mặt không xù xơ thu được bằng cách sử dụng lượng thấp hơn so với lượng có thể được mong đợi dựa trên các thử nghiệm trong xử lý vải bông chéo.

Sáng chế đề xuất polypeptit endoglucanaza của nấm mới thuộc họ glycosyl hydrolaza 45 có tính năng đáng kể ở nhiệt độ thấp. Như được sử dụng theo sáng chế, polypeptit và protein là đồng nghĩa.

Theo sáng chế, “nấm” có nghĩa là endoglucanaza hoặc polynucleotit mã hóa nó có thể thu được từ nấm, và đặc biệt là từ nấm sợi, như *Geomyces* hoặc *Fusarium*. Theo phương án cụ thể của sáng chế, endoglucanaza thu được từ *G. pannorum* hoặc *F. cf. equiseti*, tốt nhất nêu từ *G. pannorum* RF 6293 (CBS 119567), *F. cf. equiseti* RF6318 (CBS 119568), *G. pannorum* RF6546 (CBS 119958), hoặc *G. pannorum* RF6608 (CBS 119962).

Thuật ngữ "thu được từ" liên quan tới nguồn vi sinh vật có nghĩa là polypeptit có thể được sản xuất tự nhiên bởi nguồn vi sinh vật cụ thể nêu trên, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit có thể được phân lập từ nguồn vi sinh vật nêu trên, và tùy ý được biểu hiện trong tế bào chủ, mà polynucleotit hoặc phiên bản tổng hợp của chúng, có khả năng sử dụng các codon tùy chọn khác, từ nguồn vi sinh vật mã hóa polypeptit nêu trên được đưa vào đó. Tuy nhiên, không loại trừ các cải biến nhỏ về trình tự, ví dụ bằng cách thay thế, loại bỏ, và/hoặc cài xen một hoặc một số axit amin/nucleotit, miễn là vẫn giữ được hoạt tính enzym của protein đã được mã hóa và tiết.

Như được nêu trong sáng chế, “endoglucanaza” (“EG”) được dùng để chỉ các enzym được phân loại là E.C. 3.2.1.4. Chúng là 1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolaza và xúc tác quá trình nội thủy phân các liên kết 1,4-beta-D-glycosidic trong các polyme của glucoza như xenluloza. Một số endoglucanaza cũng có thể thủy phân, ví dụ các liên kết 1,4 trong beta-D-glucan cũng chứa các liên kết 1,3. Do đó, chúng cũng có thể được phân loại làm endo-1,3(4)-beta-glucanaza (E.C. 3.2.1.6). Do vậy, một enzym có thể xúc tác các phản ứng trên một số chất nền và có thể thuộc nhiều nhóm. Endoglu-

canaza theo sáng chế có thể tùy ý chứa một trình tự tín hiệu, và một hoặc nhiều miền gắn kết xenluloza (CBD) được liên kết với miền/nhân xúc tác (CD).

“Họ glycosyl hydrolaza 45” được dùng để chỉ họ glycosyl hydrolaza như được xác định trong ấn phẩm Henrissat 1991, và Henrissat and Bairoch 1993, 1996, chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Gen mã hóa họ xenlulaza 45 □ được gọi là *cel45* và protein đã được mã hóa được gọi là Cel45.

Endoglucanazas theo sáng chế có tính năng đáng kể ở nhiệt độ thấp. Theo sáng chế, “tính năng đáng kể” được dùng để các enzym có tính năng mỹ mãn khi được áp dụng trong ít nhất một loại quy trình ứng dụng xenlulaza, ví dụ như mài mòn sinh học và/hoặc xử lý hoàn thiện sinh học các hàng dệt may, hoặc trong quy trình giặt. Profin nhiệt độ độc đáo của endoglucanaza mới có thể được minh họa bằng “tỷ lệ 30:50” của chúng trong ứng dụng vải bông chéo, điều này cho biết tính năng tương đối (%) ở nhiệt độ 30°C so với 50°C. Tốt hơn nếu, tỷ lệ là 30:50 ít nhất 72%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, và tốt nhất nếu ít nhất 90% hoặc 95%. Theo cách khác, profin nhiệt độ có thể được minh họa bằng tỷ lệ “40:OT”, điều này có nghĩa là tính năng tương đối (%) ở nhiệt độ 40°C so với nhiệt độ tối ưu. Tốt hơn nếu, tỷ lệ 40:OT là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất nếu ít nhất 95%.

Như được sử dụng theo sáng chế, “hoạt tính lạnh” hoặc “nhiệt độ thấp” được dùng để chỉ nhiệt độ $\leq 50^{\circ}\text{C}$, đặc biệt là $\leq 45^{\circ}\text{C}$, tốt hơn nếu, $\leq 40^{\circ}\text{C}$, kể cả $\leq 30^{\circ}\text{C}$.

Theo một phương án của sáng chế, endoglucanaza bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 65% so với SEQ ID NO: 13, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 48% so với SEQ ID NO: 15, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 87% so với SEQ ID NO: 17, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 62% so với SEQ ID NO: 19, có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 59% so với SEQ ID NO: 21 hoặc có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 49% so với SEQ ID NO: 23, hoặc đoạn có hoạt tính enzym của nó. Tốt hơn nếu, endoglucanaza bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu, ít nhất bằng 95% và tốt nhất nếu ít nhất bằng 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 hoặc 23, hoặc đoạn có hoạt tính enzym của nó.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “mức độ tương đồng” được dùng để chỉ mức độ tương đồng toàn bộ giữa hai trình tự axit amin được so sánh với nhau từ

axit amin đầu tiên được mã hoá bởi gentrong ứng với axit amin cuối cùng. Nhằm mục đích của sáng chế, tốt hơn nếu, mức độ tương đồng được xác định bằng các chương trình máy tính đã biết bằng cách sử dụng các thuật toán chuẩn. Ví dụ về chương trình như vậy là Clone Manager Suite, chương trình bao gồm một phần chương trình Align Part và có bán ở Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA. Theo sáng chế, phiên bản chương trình “Clone Manager 7 Align Plus 5” bao gồm các hàm “Compare Two Sequences/Global/Compare DNA sequences” được sử dụng đặc biệt để xác định mức độ tương đồng. Trong trường hợp này, các thuật toán sẵn có từ các nguồn sau được sử dụng: Hirschberg, D.S. (1975), thuật toán không gian tuyến tính để tính toán các trình tự con chung dài nhất, Commun. Assoc. Comput. Mach. 18: 341-343; Myers, E.W. and W. Miller. (1988) So sánh tối ưu trong không gian tuyến tính, CABIOS 4:1, 11-17; Chao, K-M, W.R. Pearson and W. Miller. (1992) So sánh hai trình tự trong dải đường chéo định trước, CA-BIOS 8:5, 481-487. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết được rằng thực tế là các kết quả được so sánh chỉ khi so sánh các miền tương ứng của trình tự. Do đó việc so sánh, ví dụ trình tự xenulaza bao gồm CBD hoặc các trình tự tín hiệu với các trình tự tín hiệu với các chuỗi thiếu các yếu tố đó được loại trừ là không có nghĩa.

“Đoạn có hoạt tính enzym” được dùng để chỉ phần trình tự axit amin cụ thể đủ dài để có hoạt tính enzym mong muốn. Nói cách khác, ví dụ đoạn có thể chỉ là phần trưởng thành của polypeptit hoặc ngay cả trình tự con của phần trưởng thành. Nó có thể hoặc không chứa phần tử liên kết và miền CBD. Cụ thể hơn, hoạt tính enzym được dùng để chỉ hoạt tính xenulaza có khả năng xúc tác quá trình thủy phân xenuloza hoặc dẫn xuất của chúng, như hoạt tính endoglucanaza hoặc beta-glucanaza. Ngoài hoạt tính endoglucanaza và/hoặc beta-glucanaza, một số xenulaza có thể còn có hoạt tính hemicellulaza và/hoặc xylanaza. Hoạt tính enzym có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 1.

Polynucleotit theo sáng chế có thể là ADN hoặc ARN. Theo một phương án của sáng chế, các endoglucanaza được mã hoá bởi polynucleotit có SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20 hoặc 22, hoặc đoạn của chúng đủ dài để mã hóa endoglucanaza có hoạt tính enzym. Tốt hơn nếu, endoglucanaza được mã hoá bởi polynucleotit tương tự với polynucleotit của *E. coli* DSM 18916, DSM 19171, DSM 19173, DSM 18915, DSM 18917, hoặc DSM 19170.

Tốt hơn nữa, endoglucanazas theo sáng chế là các protein tái tổ hợp. Chúng được điều chế một cách thuận lợi bằng cách nói chung đã biết kỹ thuật ADN tái tổ hợp trong vật chủ dị thể hoặc đồng thể. Tốt hơn nữa, endoglucanaza được biểu hiện quá mức trong vật chủ nấm. Vấn đề, polynucleotit mã hóa endoglucanaza được tách dòng và cài xen vào vector biểu hiện, được biến nạp vào tế bào chủ và được biểu hiện.

“Vector biểu hiện” là plasmit tách dòng hoặc vector có khả năng biểu hiện ADN mã hóa các protein endoglucanaza sau khi biến nạp vào vật chủ mong muốn. Tốt hơn nữa, khi vật chủ nấm được sử dụng, gen quan tâm được cung cấp cho vật chủ nấm như là một phần của chất dẫn tách dòng hoặc biểu hiện hợp nhất vào nhiễm sắc thể nấm, hoặc cho phép gen quan tâm hợp nhất vào nhiễm sắc thể vật chủ. Các trình tự khác là một phần của chất dẫn tách dòng hoặc chất dẫn biểu hiện cũng có thể được hợp nhất với ADN nêu trên trong quy trình hợp nhất. Ngoài ra, ở nấm, vector biểu hiện hoặc các phần của chúng có thể được hướng vào nơi định trước. Theo cách khác, gen mong muốn có thể được tạo ra dưới dạng plasmit sao chép tự chủ.

Tốt hơn, nếu ADN mã hóa các protein endoglucanaza được đặt dưới sự kiểm soát của (tức là, được liên kết linh hoạt với) một số trình tự kiểm soát như các trình tự gen khởi đầu được tạo bởi vector. Khi biến nạp, các trình tự kiểm soát này hợp nhất vào bộ gen vật chủ với gen quan tâm. Theo cách khác, các trình tự kiểm soát có thể là các trình tự tại vị trí hợp nhất.

Các trình tự kiểm soát biểu hiện của vector biểu hiện sẽ thay đổi tùy thuộc vào việc vector được thiết kế để biểu hiện một số gen ở sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc ở vật chủ sinh vật có nhân điển hình. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể chứa các yếu tố điều hòa phiên mã như gen khởi đầu, yếu tố tăng cường, và các trình tự kết thúc phiên mã, và/hoặc các yếu tố điều hòa dịch mã, như các vị trí bắt đầu và kết thúc dịch mã.

Phân tử polynucleotit, như ADN, được cho là có khả năng biểu hiện polypeptit, nếu nó chứa các trình tự kiểm soát biểu hiện, các trình tự này chứa thông tin điều hòa phiên mã và các trình tự như vậy được liên kết linh hoạt với trình tự nucleotit, mã hóa polypeptit.

Liên kết linh hoạt là liên kết trong đó một trình tự được nối với trình tự (hoặc các trình tự) điều hòa theo cách sao cho để sự biểu hiện của trình tự là dưới sự tác động

hoặc kiểm soát của trình tự điều hòa. Hai trình tự ADN (như trình tự vùng gen khởi đầu được liên kết với đầu 5' của trình tự mã hóa protein) được cho là được liên kết linh hoạt nếu gen khởi đầu có chức năng tạo ra quá trình phiên mã.

Các vectơ theo sáng chế có thể còn bao gồm các yếu tố điều hòa được liên kết linh hoạt khác, như các trình tự tăng cường.

Theo phương án ưu tiên, các thể biến nạp ổn định về mặt di truyền được tạo cấu trúc, nhờ đó ADN mã hóa các protein được hợp nhất trong nhiễm sắc thể vật chủ bởi quá trình biến nạp với vectơ, có thể chứa các trình tự xúc tiến sự hợp nhất của vectơ này vào nhiễm sắc thể.

Các tế bào có ADN được hợp nhất ổn định mã hóa các protein endoglucanaza trong nhiễm sắc thể của chúng có thể được chọn, ví dụ bằng gen đánh dấu được đưa vào, đồng thể hoặc dị thể, cho phép chọn lọc các tế bào chủ chứa vectơ biểu hiện trong nhiễm sắc thể, ví dụ gen đánh dấu có thể tạo ra khả năng đề kháng thuốc diệt sinh, ví dụ, kháng các chất kháng sinh, hoặc các kim loại nặng, như đồng, hoặc các gen đánh dấu bổ sung đột biến khuyết dưỡng trong nhiễm sắc thể vật chủ, và tương tự. Ví dụ, gen đánh dấu chọn lọc có thể là gen chọn lọc được liên kết một cách trực tiếp với các trình tự gen AND cần được biểu hiện, hoặc được đưa vào cùng một tế bào bởi quá trình đồng biến nạp. Các hệ chọn lọc khác cũng có thể được sử dụng.

Khi vectơ biểu hiện chứa ADN mã hóa endoglucanaza được tạo ra, nó được đưa vào tế bào chủ thích hợp bằng nhiều thích hợp bất kỳ, bao gồm biến nạp như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau quá trình biến nạp, các tế bào nhận cảm thường phát triển trong môi trường chọn lọc thích hợp, môi trường này chọn lọc sự phát triển của các tế bào đã được biến nạp.

Ví dụ, các hệ vật chủ biểu hiện và việc sản xuất thích hợp là hệ sản xuất được phát triển đối với các vật chủ nấm *Trichoderma* (EP 244 234), hoặc *Aspergillus*, như *A. oryzae* hoặc *A. niger* (WO 97/08325 và WO 95/33386, Patent Mỹ số 5,843,745, Patent Mỹ số 5,770,418), hoặc hệ sản xuất được phát triển đối với *Fusarium*, như *F. oxysporum* (Malardier *et al.*, 1989) hoặc *Chrysosporium lucknowense*. Theo phương án ưu tiên của sáng chế, các giống vật chủ thiếu một phần xenlulaza và/hoặc hemicellulaza và/hoặc proteaza có thể được sử dụng. Các hệ sản xuất thích hợp được phát triển đối với vi khuẩn bao gồm hệ sản xuất được phát triển đối với *Bacillus*, ví dụ *B. sub-*

tilis, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* hoặc đối với *E. coli*, hoặc đối với actinomycete *Streptomyces*. Các hệ sản xuất thích hợp được phát triển đối với nấm men là các hệ được phát triển đối với *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Pichia pastoris* hoặc *Hansenula*. Các hệ sản xuất trong các vi khuẩn khác bao gồm các vi khuẩn lên men cố kết để sản xuất etanol sinh học hoặc trong các tế bào động vật có vú hoặc trong thực vật là cũng có thể được sử dụng.

Sự biểu hiện của trình tự gen đã được tách dòng dẫn đến việc sản xuất protein mong muốn, hoặc sản xuất phân đoạn của protein này. Sự biểu hiện có thể diễn ra theo cách liên tục trong các tế bào đã được biến nạp, hoặc theo cách có kiểm soát.

Để thu được chế phẩm enzym tho sáng chế, vật chủ có các đặc tính mong muốn (tức là vật chủ có khả năng biểu hiện protein endoglucanaza với lượng khả thi về mặt kinh tế) được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp, và tốt hơn nếu các enzym mong muốn được tiết từ vật chủ vào môi trường nuôi cấy, và tùy ý được thu hồi từ môi trường nuôi cấy này bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn nếu, vật chủ để sản xuất như vậy là nấm sợi, như *Trichoderma* hoặc *Aspergillus*, và đặc biệt là *T. reesei*.

Như được sử dụng theo sáng chế "chế phẩm enzym" được dùng để chỉ sản phẩm enzym bất kỳ, chứa ít nhất một endoglucanaza mới đã được mô tả theo sáng chế. Do vậy, chế phẩm enzym như vậy có thể là môi trường nuôi cấy hoặc phần dịch lọc đã qua sử dụng. Môi trường nuôi cấy đã qua sử dụng là môi trường nuôi cấy của vật chủ bao gồm các enzym đã được sản xuất. Tốt hơn nếu, các tế bào chủ được tách ra từ môi trường nêu trên sau khi sản xuất. Nếu muốn, các chế phẩm như vậy có thể được làm đông khô nhanh hoặc theo cách khác hoạt tính enzym được cô và/hoặc được làm ổn định để cất giữ. Nếu cần, enzym mong muốn có thể được phân lập và còn được tinh chế bằng các phương pháp thông thường, như lọc, chiết, kết tủa, sắc ký, sắc ký ái lực, điện di, hoặc các phương pháp tương tự khác.

Tuy nhiên, sáng chế có ưu điểm ở chỗ môi trường nuôi cấy có hoặc không có các tế bào chủ có thể được sử dụng làm chế phẩm enzym như vậy mà không cần tinh chế thêm, vì các protein endoglucanaza có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy, và chúng biểu hiện hoạt tính trong các điều kiện môi trường của môi trường nuôi cấy đã qua sử

dụng. Các chế phẩm enzym là rất kinh tế để dung cấp và sử dụng, vì việc phân lập enzym đặc hiệu từ môi trường nuôi cấy là không cần thiết.

Ngoài một hoặc nhiều protein endoglucanaza, các chế phẩm enzym có thể bao gồm một hoặc nhiều enzym khác, chúng có thể là, ví dụ các xenlulaza khác, amylaza, lipaza, proteaza, hemicellulaza, xylanaza, pectinaza và/hoặc oxidaza như laccaza, peroxidaza và catalaza. Theo cách khác, trước khi, trong khi hoặc sau khi xử lý bằng protein endoglucanaza, việc xử lý bằng enzym khác có thể được tiến hành. Việc xử lý bằng enzym có thể bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều công đoạn xử lý bằng amylaza (ví dụ để rũ hồ vải bông chéo), một hoặc nhiều công đoạn xử lý bằng xenlulaza và/hoặc một hoặc nhiều công đoạn xử lý bằng peroxidaza và/hoặc laccaza. Điều này tùy thuộc vào ứng dụng mà các enzym khác được bao gồm trong chế phẩm enzym hoặc được sử dụng trong xử lý bằng enzym.

Ngoài protein endoglucanaza, chế phẩm enzym có thể chứa các chất phụ gia, như chất làm ổn định, dung dịch đệm, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt và/hoặc các thành phần của môi trường nuôi cấy. Các chất phụ gia được ưu tiên là các chất thường được sử dụng trong chế phẩm enzym được dự định đối với ứng dụng có sử dụng chế phẩm enzym.

Các chế phẩm enzym có thể được tạo ra dưới dạng lỏng hoặc rắn, ví dụ, dưới dạng bột hoặc hạt khô, đặc biệt là hạt không sinh bụi, hoặc dưới dạng chất lỏng ổn định. Chế phẩm enzym có thể còn được làm giàu để đáp ứng các yêu cầu đối với việc sử dụng cụ thể trong các ứng dụng khác nhau, ví dụ trong công nghiệp dệt. Hỗn hợp gồm các hoạt tính enzym được tiết bởi vật chủ có thể là có lợi trong ứng dụng công nghiệp cụ thể, ví dụ trong xử lý hoàn thiện sinh học và mài mòn sinh học.

Các protein endoglucanaza và các chế của chúng có thể được sử dụng, ví dụ trong lĩnh vực dệt may, thực phẩm và thức ăn, ví dụ thực phẩm nướng, trong thủy phân sinh khối, ví dụ trong sản xuất etanol sinh học, và trong dầu thực vật, chất tẩy rửa, và công nghiệp giấy và bột giấy. Chúng có thể được sử dụng để xử lý vật liệu xenluloza bất kỳ, như vật liệu dệt may, thực vật hoặc vật liệu có nguồn gốc thực vật được sử dụng trong thực phẩm hoặc thức ăn, vật liệu thực vật để chiết lấy dầu, hoặc bột giấy cơ học hoặc hoá học thu được từ gỗ hoặc sợi thứ cấp. Chúng cũng có thể được bổ sung vào chất tẩy rửa, ví dụ để cải thiện các đặc tính dưỡng vải bằng cách chống

nổi hạt xoắn, chống nổi tông màu đậm nhạt, làm rõ màu và làm mềm vải, và để cải thiện tác dụng làm sạch vải dệt, ví dụ loại bỏ chất bẩn. Chế phẩm tẩy rửa còn thường chứa các chất hỗ trợ, như chất hoạt động bề mặt (chất hoạt động bề mặt anion, không ion, cation và chất điện ly lưỡng tính), các hợp phần và các thành phần tùy ý khác như chống lắng phủ lại và tác nhân tạo huyền phù chất bẩn, chất tẩy trắng quang học, chất tẩy trắng, thuốc nhuộm và chất tạo màu và hydrolaza.

Theo sáng chế, “vật liệu xenluloza” được dùng để chỉ vật liệu bất kỳ chứa thành phần quan trọng là xenluloza hoặc các dẫn xuất của chúng. Vật liệu xenluloza được cho tiếp xúc với lượng hữu hiệu protein trong các điều kiện thích hợp, như độ pH, và nhiệt độ thích hợp, và phản ứng được diễn ra liên tục trong thời gian đủ để xảy ra phản ứng tổng hợp. Tốt hơn nếu endoglucanaza nêu trên được sử dụng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 50°C, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 50°C. Nhiệt độ hữu ích là $\leq 50^\circ\text{C}$, ví dụ $\leq 45^\circ\text{C}$, hoặc trong một số trường hợp $\leq 40^\circ\text{C}$, hoặc ngay cả $\leq 30^\circ\text{C}$. Khoảng pH thích hợp là từ 3 đến 9, tốt hơn nếu từ 4 đến 8, và đặc biệt là từ 5 đến 6,5.

Endoglucanaza đặc biệt là hữu ích trong xử lý vật liệu dệt may, như vải và các sản phẩm dệt may hoặc sợi. Vật liệu dệt may có thể được sản xuất từ xenluloza tự nhiên chứa các xơ hoặc xenluloza tổng hợp chứa các xơ hoặc hỗn hợp của chúng, hoặc hỗn hợp của các xơ tổng hợp và các xơ chứa xenluloza. Tốt hơn nếu, vật liệu chứa xenluloza là bông, đặc biệt là vải bông chéo. Trong sáng chế, thuật ngữ “vải bông chéo” được dùng để chỉ vải bông chéo vải, thường là các sản phẩm dệt may bằng vải bông chéo, đặc biệt là vải bò. Có lợi nếu vải bông chéo là vải bông chéo được nhuộm màu Indigo. Vải bông chéo cũng có thể được xử lý bằng các dẫn xuất của Indigo hoặc bằng Indigo cùng với một số thuốc nhuộm khác, ví dụ vải bông chéo được nhuộm indigo với chất hấp lưu huỳnh.

Endoglucanaza nêu trên là đặc biệt hữu ích trong công nghiệp dệt, tốt hơn nếu, trong xử lý mài mòn sinh học và hoàn thiện bằng sinh học.

Việc giặt bằng đá bao gồm ba bước: rũ hồ, mài và xử lý hoàn tất. Bước thứ nhất, bước rũ hồ thường là bước xử lý ướt đầu tiên vải bò và loại bỏ tinh bột hoặc các chất hồ khác thường được dùng cho các sợi dọc để ngăn ngừa việc làm tổn hại trong quá trình dệt. Alpha-amylaza được sử dụng để loại bỏ các chất hồ trên cơ sở tinh bột để xử

lý ướt cải thiện và đồng đều. Sau khi rũ hồ, vải bò thường được giặt bằng nước hoặc được trực tiếp cho qua bước mài.

Bước thứ hai, bước mài, có thể được tiến hành bằng các enzym hoặc đá bọt hoặc cả hai. Trong tất cả các trường hợp, tác dụng cơ học là cần thiết để loại bỏ thuốc nhuộm, và việc xử lý thường được tiến hành trong thiết bị giặt, như các thùng giặt. Thuật ngữ “được mài” được dùng để chỉ về bề ngoài của vải bông chéo, khi nó được xử lý bằng các enzym xenlulaza hoặc đá, hoặc cả hai. Các thuật ngữ “kiểu giặt” hoặc “kiểu mòn” cũng là đồng nghĩa. Kết quả của việc loại bỏ thuốc nhuộm không đều là sự tương phản giữa vùng được nhuộm và vùng loại bỏ thuốc nhuộm.

Sau bước mài thường là bước thứ ba, xử lý hoàn tất bao gồm bước giặt và giữ, trong đó chất tẩy rửa, chất tẩy trắng quang học, chất tẩy trắng hoặc chất làm mềm có thể được sử dụng. Sau khi xử lý bằng enzym, phản ứng cần được dừng để ngăn ngừa sự làm tổn hại của vật liệu đã được xử lý, ví dụ bởi nhiệt độ và/hoặc sự làm mất hoạt tính pH, việc này bao gồm giữ sạch và/hoặc giặt sạch chất tẩy rửa. Điều này bảo đảm rằng độ bền cơ học của sợi là không bị tổn hại thêm do sự có mặt liên tục của enzym.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "mài mòn sinh học" vải hoặc hàng may mặc được dùng để chỉ việc sử dụng các enzym thay cho, hoặc kết hợp cùng, đá bọt để xử lý vải hoặc hàng may mặc, đặc biệt là vải bông chéo.

Như nêu trên, xử lý bằng xenlulaza hoàn toàn có thể thay thế xử lý bằng đá bọt. Tuy nhiên, việc xử lý bằng xenlulaza cũng có thể được kết hợp với xử lý bằng đá bọt, nếu muốn xử lý hoàn thiện mài ở mức độ cao.

Ngoài ra, endoglucanaza cũng có thể được sử dụng trong xử lý hoàn thiện sinh học vải và các sản phẩm dệt may. “Xử lý hoàn thiện sinh học” (còn được gọi là loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn, loại bỏ xơ xù, loại bỏ lông hoặc đánh bóng sinh học) được dùng để chỉ việc sử dụng enzym trong quá trình thủy phân có kiểm soát các xơ xenluloza để cải biến bề mặt vải hoặc sợi theo cách sao cho để hoàn toàn ngăn ngừa được khả năng nổi hạt xoắn, làm cải thiện việc xử lý vải như độ mềm và trơn nhẵn, làm rõ cấu trúc bề mặt bởi việc làm giảm xơ xù, dẫn đến việc làm rõ màu và cũng có thể cải thiện khả năng xếp nếp, khả năng hút ẩm và khả năng nhuộm màu của vải.

Các sử dụng bổ sung bao gồm sử dụng trong chế phẩm tẩy rửa để cải thiện các đặc tính dưỡng vải bằng cách chống nổi hạt xoắn, chống nổi tông màu đậm nhạt, làm rõ màu và làm mềm, và để cải thiện tác dụng làm sạch vải dệt, ví dụ loại bỏ chất bẩn.

Việc loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn bằng enzym có thể được tiến hành ở giai đoạn bất kỳ trong quá trình xử lý ướt vải dệt, tốt hơn nếu, sau khi rũ hồ và/hoặc tẩy trắng tùy ý, và các điều kiện tương tự như trong mài mòn sinh học có thể được sử dụng. Các hàng dệt may ở dạng hàng may mặc cũng có thể được xử lý.

Tỷ lệ dung dịch (tỷ lệ giữa thể tích chất lỏng và trọng lượng vải) trong cả mài mòn sinh học và xử lý hoàn thiện sinh học có thể nằm trong khoảng từ khoảng 3:1 tới 20:1, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5:1 tới 10:1. Thời gian xử lý có thể nằm trong khoảng từ 15 phút đến 90 phút, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 30 phút đến 60 phút. Cần phải nhấn mạnh rằng liều lượng enzym phụ thuộc nhiều vào loại vải, thiết bị, các điều kiện xử lý (độ pH, nhiệt độ, tỷ lệ dung dịch, thời gian xử lý, lượng vải bông chéo, quy mô của quy trình) và loại chế phẩm enzym và các điều kiện tương tự. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể xác định các liều lượng và điều kiện thích hợp.

Quy trình theo sáng chế để xử lý vật liệu xenluloza cũng bao gồm việc thủy phân vật liệu lignoxenluloza để sản xuất etanol sinh học chẳng hạn. Một ví dụ về sử dụng xử lý sinh học cố kết (consolidated bioprocessing (CBP)) trong thủy phân vật liệu lignoxenluloza đã được, ví dụ Zyl *et al.* mô tả trong ấn phẩm Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007;108:205-35.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa bằng các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế sau.

Ví dụ 1. Sàng lọc các giống biểu hiện hoạt tính thủy phân xenlulô ở nhiệt độ thấp

Khoảng 180 giống nấm trong bộ sưu tập giống cây Roal Oy được thử nghiệm về khả năng của chúng để tạo ra hoạt tính thủy phân xenlulô ở nhiệt độ thấp. Các giống nấm được nuôi cấy trong thể tích 100 ml trên máy lắc quay tròn (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 20°C trong thời gian từ 3 đến 7 ngày. Một số môi trường sinh sản được thử nghiệm chứa nguồn cacbon là xenluloza Solka Floc. Sau khi nuôi cấy các tế bào và các chất rắn khác được thu gom bằng cách ly tâm và dịch nổi bề mặt được thu hồi. Nếu

không được sử dụng ngay lập tức, chế phẩm được lưu giữ dưới dạng từng phần nhỏ ở nhiệt độ -20°C.

Để đánh giá hoạt tính enzyme ở nhiệt độ thấp hơn, các thử nghiệm được tiến hành đối với chế phẩm nuôi cấy trong bình lắc ở nhiệt độ 30°C và 50°C trong 1 giờ. Tất cả dịch nổi bề mặt trong bình lắc được thử nghiệm đối với các hoạt tính sau:

Hoạt tính endoglucanaza (CMCase):

Hoạt tính này được thử nghiệm với 3% (khối lượng/thể tích) carboxymethylxenuloza (CMC) làm chất nền trong 50 mM dung dịch đệm xitrat về cơ bản như được mô tả trong ấn phẩm Bailey and Nevalainen 1981; Haakana *et al.*, 2004. Đường khử được đo với the DNS thuốc thử. Thử nghiệm được tiến hành cả ở độ pH 5,0 và 7,0.

Hoạt tính endoglucanaza (HEC) :

Hoạt tính này được thử nghiệm với 1% (khối lượng/thể tích) hydroxyethylxenuloza (HEC) làm chất nền trong 50 mM dung dịch đệm xitrat về cơ bản như được mô tả trong ấn phẩm Bailey and Nevalainen 1981. Việc khử đường được đo bằng thuốc thử DNS. Thử nghiệm này được tiến hành cả ở độ pH 5,0 lẫn 7,0.

Các chế phẩm dịch nổi bề mặt nuôi cấy của các giống được thử nghiệm trong ứng dụng mài mòn sinh học quy mô nhỏ trong thiết bị LP-2 Launder Ometer là như sau. Khoảng 7,2 g các mẫu vải bông chéo đã được rũ hồ (12x12 cm) được nạp cùng với các viên bi thép vào vật đựng dung tích 1,2 lít chứa 100 ml dung dịch đệm Mc Ilvaine's và 100 ml dịch nổi bề mặt nuôi cấy, và Launder Ometer được vận hành ở 30°C trong thời gian 120 phút. Sau khi giặt bằng kiềm và chất tẩy rửa, các mẫu vải được giặt một cách cẩn thận bằng nước ấm và được làm khô bằng không khí. Các kết quả được đánh giá cả bằng mắt và bằng cách đo màu dưới dạng các hệ số phản xạ (dữ liệu không thể hiện).

Sau khi sàng lọc sơ bộ, 4 giống (*Geomyces pannorum* RF6293, RF6546 và RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318) được chọn đũa với các nghiên cứu áp dụng bổ sung. Nhằm mục đích đó, các giống RF6546 và RF6608 được nuôi cấy trong thể tích 200 ml trên máy lắc quay tròn (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 20°C trong thời gian từ 4 đến 7 ngày trong môi trường chứa (g/lít): Solka Flocc xenluloza 10,0, bột ngô 1,5, bột đậu tương 0,5, CaCO₃ 0,5, (NH₄)₂HPO₄ 1,5, KH₂PO₄ 2,0, MgSO₄·H₂O 0,5, NaCl

0,5, NH_4NO_3 0,5, Tween-80 0,5, dung dịch nguyên tố vi lượng #1 0,5, dung dịch nguyên tố vi lượng #2 0,5, parafin dầu 0,5; độ pH được điều chỉnh tới 6,4. Dung dịch nguyên tố vi lượng #1 (mg/lít): MnSO_4 1,6, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,45, $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,0; Dung dịch nguyên tố vi lượng #2 (mg/lít): $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0. Các giống RF6293 và RF6318 được nuôi cấy trong thể tích 200 ml trên máy lắc quay tròn (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 20°C trong thời gian từ 4 đến 6 ngày trong môi trường chứa g/lít: Solka Floc xenluloza 30,0, bột ngô 9,0, bột đậu tương 1,5, CaCO_3 1,5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4,5, KH_2PO_4 6,0, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5, NaCl 0,5, NH_4NO_3 1,5, Tween-80 0,5, dung dịch nguyên tố vi lượng #1 0,5, dung dịch nguyên tố vi lượng #2 0,5, parafin dầu 0,5; độ pH được điều chỉnh tới 6,4. Dung dịch nguyên tố vi lượng #1 (mg/lít): MnSO_4 1,6, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,45, $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,0; Dung dịch nguyên tố vi lượng #2 (mg/lít): $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0.

Ví dụ 2. Tách dòng các gen endoglucanaza từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Các phương pháp phân tử sinh học chuẩn được sử dụng trong việc phân lập và xử lý bằng enzym đối với ADN (các plasmit, đoạn ADN), trong quá trình biến nạp *E. coli*, v.v.. Các phương pháp cơ bản này được sử dụng đã được mô tả trong sinh học phân tử chuẩn sổ tay hướng dẫn, ví dụ Sambrook *et al.* (1989) và Sambrook và Russell (2001).

Lambda DASH[®] II/*Bam*HI vectơ (Stratagene, USA) được sử dụng để xây dựng các thư viện gen đối với *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Các ADN nhiễm sắc thể, được phân lập bằng phương pháp được nêu trong ấn phẩm Raeder and Broda (1985), một phần được phân giải bằng *Sau*3A. Các ADN phân giải được phân đoạn theo kích thước và các phần đoạn có kích thước được chọn (từ 5 đến 20 kb) được buộc vào các nhánh vectơ lambda đã được phân giải bằng *Bam*HI. Các hỗn hợp nối được bao gói bằng cách sử dụng các phần chiết bao gói Gigapack III Gold theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Stratagene, USA). Các hiệu giá của các thư viện gen đã được xây dựng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Các hiệu giá của các thư viện gen đã được xây dựng

Giống	Hiệu giá của thư viện gen pfu/ml ($\times 10^6$)	Hiệu giá của thư viện gen đã được khuếch đại pfu/ml ($\times 10^8$)
<i>Geomyces pannorum</i> RF6293	0,38	100,0
<i>Geomyces pannorum</i> RF6546	0,04	6
<i>Geomyces pannorum</i> R6608	0,04	0,3
<i>Fusarium cf. equiseti</i> RF6318	0,46	60,0

Các thư viện gen của *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608 và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 được sàng lọc bằng các mẫu lai thử được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi thoái hóa và ADN hệ gen làm khuôn mẫu. Các trình tự của các đoạn môi di thể dựa trên các trình tự endoglucanaza bảo toàn (Bảng 2, SEQ ID NO: 1-5). Các trình tự bảo toàn này được xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin đã được công bố trước đây của *Humicola grisea* var. *thermoidea* AB003107, *Fusarium oxysporum* L29381, *Melanocarpus albomyces* AJ515703 và *Gibberella zeae* AY342397. Hỗn hợp phản ứng PCR chứa 10 mM Tris-HCl, độ pH 8,8, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTPs, 1 μ M mỗi đoạn môi và từ 1 đến 2 đơn vị Dynazyme II ADN polymeaza (Finnzymes, Finland) và từ 0,5 đến 1 μ g ADN hệ gen. Các điều kiện đối với các phản ứng PCR là như sau: 5 phút biến tính đầu ở nhiệt độ 95°C, tiếp đó là 30 chu trình 1 phút ở nhiệt độ 95°C, 30 giây ủ ở nhiệt độ 52,5°C ($\pm 7,5^\circ\text{C}$ gradien), 1 phút kéo dài ở nhiệt độ 72°C và kéo dài lần cuối ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 5 phút. Các khuôn mẫu ADN hệ gen được sử dụng trong các phản ứng PCR được đưa ra trong bảng 3.

Bảng 2. Oligonucleotit thoái hóa được thử nghiệm làm đoạn môi PCR để khuếch đại các mẫu lai thử để sàng lọc các gen endoglucanaza từ *Geomyces pannorum* RF6547, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Oligonucleotit	Chiều dài(bp)	Chuỗi ^(a)	SEQ ID NO.
Cel45_S1	20	TAYTGGGAYTGYTGYYAARCC (s)	1
Cel45_S2	17	TGGTGYTGYGCNTGYTA (s)	2
Cel45_AS1	17	TARCANGCRCARCACCA (as)	3
Cel45_AS2	17	GTRCANCRCRTCRAADAT (as)	4
Cel45_AS3	23	TTRTCSGCRTTYTGRAACCARTC (as)	5

^(a) D = A hoặc G hoặc T, R = A hoặc G, S = C hoặc G, N = A hoặc G hoặc T hoặc C, Y = T hoặc C; “s” trong dấu ngoặc đơn = sợi có nghĩa, “as” trong dấu ngoặc đơn = sợi đối nghĩa.

Các sản phẩm ADN có kích thước mong đợi (được ước tính từ các trình tự endoglucanaza đã được công bố) thu được từ một số phản ứng. Các đoạn ADN có kích thước mong đợi được phân lập từ các phản ứng PCR đặc hiệu nhất và chúng được tách dòng thành vector pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen, USA). Các đoạn xen được xác định đặc điểm bằng cách sắp xếp theo trình tự và bằng cách thực hiện việc lai hóa thâm Nam đối với các ADN hệ gen được phân giải bằng một số enzym giới hạn. Các đoạn PCR, được chọn để sử dụng làm các mẫu lai thử để sàng lọc *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 các thư viện gen được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Các đoạn mồi được sử dụng trong các phản ứng PCR và các mẫu lai thử được chọn để sàng lọc các gen endoglucanaza từ các thư viện gen *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318. ADN khuôn mẫu hệ gen và tên của plasmit chứa mẫu lai thử được thể hiện.

Gen	Đoạn mồi xuôi	Đoạn mồi ngược	ADN hệ gen được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR	Đoạn thu được (kb)	SEQ ID NO	Đoạn xen trong plasmit
RF6293_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6293	0,6 kb	6	pALK2038
RF6293_cel45B	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6289	0,6 kb	7	pALK2039
RF6318_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6318	0,6 kb	8	pALK2047
RF6546_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6546	0,6 kb	9	pALK2040
RF6608_cel45A	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6608	0,6 kb	10	pALK2042
RF6608_cel45B	Cel45_S1	Cel45_AS3	RF6608	0,6 kb	11	pALK2041

Các trình tự axit amin được suy ra từ tất cả các mẫu lai thử có mức độ tương đồng với một số trình tự Cel45 đã được công bố (chương trình BLAST, phiên bản 2.2.9 ở NCBI, National Center for Biotechnology Information; Altschul *et al.*, 1990).

Các đoạn xen từ các plasmit được liệt kê trong bảng 3 được đánh dấu bằng digoxigenin theo hướng dẫn của nhà cung cấp (Roche, Germany). Các thư viện gen đã được khuếch đại (từ 1×10^5 đến 6×10^5 vết tan) được sàng lọc bằng các mẫu lai thử đánh dấu. Nhiệt độ lai đối với các bộ lọc là 68°C và các bộ lọc được rửa 2×5 phút ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng $2 \times \text{SSC}-0,1\%$ SDS tiếp đó là 2×15 phút ở nhiệt độ 68°C bằng cách sử dụng $0,1 \times \text{SSC}-0,1\%$ SDS. Một số vết tan dương tính thu được từ mỗi lần lai hoá. 5 vết tan lai hóa mạnh được tinh chế từ mỗi lần sàng lọc. Các ADN thể

thực khuẩn được phân lập và được xác định đặc điểm bằng các lai hoá thẩm Nam. Các đoạn giới hạn được chọn lai hóa mẫu lai thử được tách dòng phụ thành vector pBluescript II KS+ và các vùng liên quan của các dòng vô tính được sắp xếp trình tự.

Tổng cộng, 6 gen *cel45* được tách dòng; một gen từ các giống *Geomyces pannorum* RF6546 và *Fusarium cf. equiseti* RF6318, và hai gen *cel45* từ các giống *Geomyces pannorum*, RF6293 và RF6608. Bảng 4 tóm tắt thông tin về các mẫu lai thử được sử dụng để sàng lọc gen, các dòng thể thực khuẩn mà từ đó các gen được phân lập, các đoạn giới hạn được chọn chứa các gen có chiều dài đầy đủ với của các vùng gen khởi đầu và gen kết thúc chúng, tên plasmid, và số nộp lưu DSM đối với các chủng *E. coli* mang các plasmid này.

Bảng 4. Các mẫu lai thử được sử dụng để tách dòng các gen endoglucanaza, dòng thể thực khuẩn và các dòng phụ được chọn, số plasmid và số nộp lưu của chủng *E. coli* tương ứng

Gen	Mẫu lai thử được sử dụng trong sàng lọc	Dòng thể thực khuẩn	Đoạn được tách dòng phụ thành pBluescript II KS+	Plasmid số	Số nộp lưu <i>E. coli</i>
<i>Gp</i> _RF6293_ <i>cel45A</i>	pALK2038	F78	3,5 kb <i>HindIII</i>	pALK2206	DSM 18916
<i>Gp</i> _RF6293_ <i>cel45B</i>	pALK2039	F105	2,3 kb <i>XbaI</i>	pALK2221	DSM 19171
<i>Fe</i> _RF6318_ <i>cel45A</i>	pALK2047	F122	2,5 kb <i>EcoRI</i>	pALK2226	DSM 19173
<i>Gp</i> _RF6546_ <i>cel45A</i>	pALK2040	F85	6,0 kb <i>NotI</i>	pALK2208	DSM 18915
<i>Gp</i> _RF6608_ <i>cel45A</i>	pALK2042	F88	2,5 kb <i>XbaI</i>	pALK2207	DSM 18917
<i>Gp</i> _RF6608_ <i>cel45B</i>	pALK2041	F108	9,0 kb <i>XbaI</i>	pALK2219	DSM 19170

Thông tin liên quan về các gen và các trình tự protein suy diễn (SEQ ID NO: 12-23) lần lượt được tóm tắt trong bảng 5 và Bảng 6.

Bảng 5. Tóm tắt các gen endoglucanaza được phân lập từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Gen	Chiều dài với các intron (bp) ^(a)	Vùng mã hoá (bp) ^(b)	Số các intron	Chiều dài của các intron (bp)	SEQ ID NO:
<i>Gp</i> _RF6293_ <i>cel45A</i>	1036	912	1	121	12
<i>Gp</i> _RF6293_ <i>cel45B</i>	966	846	2	58,59	14
<i>Fe</i> _RF6318_ <i>cel45A</i>	1162	1098	1	61	16
<i>Gp</i> _RF6546_ <i>cel45A</i>	1028	912	1	113	18
<i>Gp</i> _RF6608_ <i>cel45A</i>	1026	912	1	111	20
<i>Gp</i> _RF6608_ <i>cel45B</i>	969	846	2	61, 59	22

^(a) Bao gồm codon kết thúc

^(b) Không bao gồm codon kết thúc

Bảng 6. Tóm tắt các trình tự axit amin được suy ra từ các trình tự gen endoglucanaza từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318

Protein endoglucanaza	Số aas	Chiều dài của ss NN ^(a)	CBD ^(b)	MW tiên đoán (Da), không bao gồm ss ^(c)	pI tiên đoán (không bao gồm ss)	SEQ ID NO:
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	304	22	T247 tới L282	28678	5,13	13
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45B	282	26		27309	4,17	15
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	366	20	A306 tới N346	36284	8,25	17
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	304	22	T247 tới L282	28762	4,93	19
<i>Gp</i> _RF6608_Cel45A	304	22	T247 tới L282	28504	4,33	21
<i>Gp</i> _RF6608_Cel45B	282	26		30324	4,37	23

^(a) Việc tiên đoán về trình tự tín hiệu được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình SignalP V3,0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004); giá trị NN thu được bằng cách sử dụng mạng thần kinh.

^(b) Miền gắn kết xenluloza (CBD), các axit amin của vùng CBD được chỉ định. Trình tự tín hiệu tiên đoán không được bao gồm.

^(c) Việc đoán về trình tự tín hiệu được thực hiện bằng cách sử dụng công cụ Compute pI/MW trên máy chủ ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003).

Việc so sánh các trình tự Cel45 được suy ra từ các chủng *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 với nhau được thể hiện trong bảng 7 và Bảng 8. Cả các trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ và các protein nhân không có vùng CBD của các trình tự Cel45 được suy diễn được thể hiện. Chương trình Clone Manager (phiên bản 9) bao gồm các hàm “Compare Two Sequences/Global/Compare sequences as amino acids/BLOSUM62 scoring matrix” được sử dụng để xác định mức độ tương đồng.

Bảng 7. Các giá trị mức độ tương đồng (%) thu được từ việc so sánh các trình tự axit amin Cel45 được suy ra từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546 và RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Các trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bao gồm các trình tự tín hiệu được so sánh.

Protein	Gp_RF6293 Cel45A	Gp_RF6293 Cel45B	Fe_RF6318 Cel45A	Gp_RF6546 Cel45A	Gp_RF6608 Cel45A	Gp_RF6608 Cel45B
Gp_RF6293_Cel45A	100	39	46	85	87	38
Gp_RF6293_Cel45B		100	30	40	38	89
Fe_RF6318_Cel45A			100	45	45	31
Gp_RF6546_Cel45A				100	87	38
Gp_RF6608_Cel45A					100	38
Gp_RF6608_Cel45B						100

Bảng 8. Các giá trị mức độ tương đồng (%) thu được từ việc so sánh các trình tự axit amin Cel45 được suy ra từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318. Các trình tự nhân không bao gồm trình tự tín hiệu và các vùng phần tử liên kết-CBD được so sánh.

Protein	Gp_RF6293 Cel45A	Gp_RF6293 Cel45B	Fe_RF6318 Cel45A	Gp_RF6546 Cel45A	Gp_RF6608 Cel45A	Gp_RF6608 Cel45B
Gp_RF6293_Cel45A	100	41	58	88	89	41
Gp_RF6293_Cel45B		100	39	42	42	89
Fe_RF6318_Cel45A			100	60	60	39
Gp_RF6546_Cel45A				100	92	42
Gp_RF6608_Cel45A					100	41
Gp_RF6608_Cel45B						100

Việc so sánh các trình tự endoglucanaza Cel45 được suy ra từ *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 với các trình tự được tìm thấy trong dữ liệu được thể hiện trong các bảng 9A và 9B.

Bảng 9A. Các trình tự có mức độ tương đồng cao nhất với các trình tự endoglucanaza suy diễn của *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, RF6608, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318.

Sinh vật và số nộ lưu	Mức độ tương đồng (%)
Gp_RF6293_Cel45A	100
<i>Neurospora crassa</i> , XM_952014	57
Gp_RF6293_Cel45B	100
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , XM_001935986	47

<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	100
<i>Gibberella zeae</i> , AY342397	86
<i>Gibberella zeae</i> , XM_382834	86
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	100
<i>Neurospora crassa</i> , XM_952014	57
<i>Gp</i> _RF6608_Cel45A	100
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , XM_001597582	58
<i>Gp</i> _RF6608_Cel45B	100
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , XM_001935986	48

Các trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bao gồm các trình tự tín hiệu được so sánh. Việc tra cứu dữ liệu được tiến hành bằng cách sử dụng BLAST (tblastn, nr/nt dữ liệu), và chương trình Clone Manager 9 (So sánh hai trình tự/Global/so sánh các trình tự dưới dạng các axit amin/ma trận ghi BLOSUM62) được sử dụng để xác định mức mức độ tương đồng.

Bảng 9B. Mức độ tương đồng cao nhất của các trình tự trong công bố patent với các trình tự endoglucanaza suy diễn của *Geomyces pannorum* RF6293, RF6546, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318.

Sinh vật và số nộp lưu	Mức độ tương đồng (%)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	100
US7256032, SEQ ID: 21	64
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	100
US5610129 A, SEQ ID: 4	78
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	100
US2005070003A1, SEQ ID: 6	61

Các trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bao gồm các trình tự tín hiệu được so sánh. Hệ thống đăng ký dịch vụ tóm tắt hóa chất (CAS), DGEGE và các tra cứu dữ liệu NCBI trình tự protein đã được cấp bằng (So sánh hai trình tự/Global/so sánh các trình tự dưới dạng các axit amin/ma trận ghi BLOSUM62) được sử dụng để xác định mức mức độ tương đồng.

Ví dụ 3. Sản xuất các protein Cel45 tái tổ hợp trong *Trichoderma reesei*

Các plasmit biểu hiện được xây dựng để biểu hiện quá mức các protein Cel45 tái tổ hợp từ *Geomyces pannorum* RF6293 và RF6546, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318

trong *Trichoderma reesei*. Các plasmit biểu hiện đã được xây dựng được đưa ra trong bảng 10. Các gen *cel45* tái tổ hợp, bao gồm các trình tự tín hiệu của chính chúng, được dung hợp chính xác thành gen khởi đầu *T. reesei cbh1/cel7* (p cbh1). Quá trình kết thúc phiên mã được bảo đảm bằng gen kết thúc *T. reesei cbh1/cel7A* (t cbh1) và gen đánh dấu *A. nidulans amdS* được sử dụng để chọn lọc các thể biến nạp như được mô tả trong ấn phẩm Paloheimo *et al.* (2003). Các băng biểu hiện tuyến tính (Fig. 1) được phân lập từ mạch chính vectơ sau khi phân giải *NotI* và được biến nạp vào các tế bào trần *T. reesei* A47 và/hoặc A51 (cả hai giống đều có các gen mã hóa 4 xenlulaza chính CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B và EGII/Cel5A đã được loại bỏ). Các quá trình biến nạp được tiến hành như được nêu trong ấn phẩm Penttilä *et al.* (1987) với các cải biến đã được mô tả trong Karhunen *et al.* (1993), trong khi chọn axetamid làm nguồn nitơ duy nhất (gen đánh dấu *amdS*). Các thể biến nạp được tinh chế trên các đĩa chọn lọc qua các bảo tử đính đuron trước khi chúng được hình thành bào tử trên PD.

Bảng 10. Các băng biểu hiện được tạo cấu trúc để sản xuất dư thừa các protein Cel45 từ *Geomyces pannorum* RF6293 và RF6546, và *Fusarium cf. equiseti* RF6318 trong *Trichoderma reesei*.

Protein endoglu- canaza	Plasmit biểu hiện	Băng biểu hiện (a)	Gen kết thúc ^(b)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	pALK2215	8,6 kb <i>NotI</i>	196 bp (<i>MlyI</i>)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45B	pALK2224	8,6 kb <i>NotI</i>	196 bp (<i>SalI</i>)
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	pALK2230	8,9 kb <i>NotI</i>	335 bp (<i>EcoRI</i>)
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	pALK2218	8,6 kb <i>NotI</i>	225 bp (<i>SspI</i>)

Toàn bộ cấu trúc của các băng biểu hiện là như được mô tả trên Fig. 1. Các gen *cel45* tách dòng được dung hợp chính xác thành gen khởi đầu *T. reesei cbh1/cel7*.

^(a) Băng biểu hiện đối với quá trình biến nạp *T. reesei* được phân lập từ mạch chính vectơ bằng phân giải *NotI*.

^(b) Số nucleotit sau codon kết thúc của gen tái tổ hợp đã được tách dòng được bao gồm trong băng biểu hiện. Vị trí giới hạn ở đầu 3' của đoạn gen của bộ gen được sử dụng để tạo cấu trúc băng biểu hiện được chỉ ra trong dấu ngoặc đơn.

Việc sản xuất endoglucanaza của các thể biến nạp được phân tích từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy của việc nuôi cấy trong bình lắc (50 ml). Các thể biến nạp được sinh trưởng trong thời gian 7 ngày trong môi trường cảm ứng xenlulaza trên cơ sở lactoza

phức hợp (Joutsjoki *et al.* 1993) được đệm bằng 5% KH_2PO_4 . Hoạt tính endoglucanaza được thử nghiệm với 3% (khối lượng/thể tích) carboxymetylxenluloza (CMC) làm chất nền trong 50 mM dung dịch đệm xitrat theo Bailey và Nevalainen 1981 và Haakana *et al.*, 2004. Kiểu gen của thể biến nạp được chọn được xác nhận bằng cách sử dụng phương pháp thẩm Nam, trong đó một số phần thủy phân của bộ gen được bao gồm và bằng biểu hiện tương ứng được sử dụng làm mẫu lai thử. Việc sản xuất dị thể các protein endoglucanaza tái tổ hợp được phân tích bằng cách SDS-PAGE với việc nhuộm Coomassie sau đó.

Các chế phẩm enzyme Cel45A tái tổ hợp được đặc trưng bởi độ pH tối ưu và độ ổn định nhiệt. Độ pH tối ưu của các protein Cel45A được sản xuất quá mức được xác định trong dung dịch đệm McIlvaine phổ dụng với độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0 bằng cách sử dụng 3% (khối lượng/thể tích) carboxymetylxenluloza (CMC) làm chất nền (Fig. 2A). Độ ổn định nhiệt của các protein endoglucanaza tái tổ hợp được xác định bằng cách đo hoạt tính CMCase trong dung dịch đệm McIlvaine phổ dụng ở độ pH tối ưu với thời gian phản ứng 1 giờ (Fig. 2B).

Các thể biến nạp sản sinh endoglucanaza được chọn được nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học phòng thí nghiệm ở nhiệt độ 28°C trong môi trường nêu trên trong thời gian từ 3 đến 4 ngày với độ pH được khống chế ở $4,4 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) để thu được chất dùng cho các thử nghiệm ứng dụng. Dịch nổi bề mặt được thu hồi bằng cách ly tâm và lọc qua các bộ lọc Seitz-K 150 và EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Germany).

Ví dụ 4. Tính năng của các protein Cel45 tái tổ hợp trong xử lý vải bông chéo ở các nhiệt độ khác nhau

Các protein Cel45 tái tổ hợp được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 3 bằng cách sử dụng *Trichoderma* làm vật chủ được thử nghiệm về tác dụng của chúng trong việc mài mòn sinh học vải bông chéo ở các nhiệt độ khác nhau để tạo ra kiểu mài tương tự với kiểu mài có được bằng đá bọt. Các enzyme Cel45 thương phẩm Ecoston[®]N400 (Roal Oy, Finland) và Denimax[™] 399S (Novozymes) được sử dụng để so sánh.

Một cặp vải bò được tạo ra bằng vải bông vân chéo nhuộm Indigo màu thu được từ nhà cung cấp Anh quốc được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm chính sau khi rửa hồ bằng ECOSTONE® A200 alpha-amylaza và 2 cặp vải bò Apache đã được rửa hồ vải (Labels Fashion Limited, U.K.) làm vật liệu thử nghiệm phụ. Việc xử lý bằng xenlulaza được tiến hành bằng máy giặt vắt Wascator FOM 71 CLS của Electrolux trong những điều kiện đã được mô tả trong bảng 11.

Bảng 11. Các điều kiện thử nghiệm/thông số quy trình được sử dụng trong xử lý bằng xenlulaza

Thông số quy trình	
Lượng vải bông chéo	1,6 kg
Nước	17 lít
Kiểm soát dung dịch đệm/độ pH (pH 6)	Được điều chỉnh bằng $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ và axit xitric
Thời gian	55 phút
Nhiệt độ	20, 30, 40, 50 hoặc 60°C
Liều lượng xenlulaza	từ 250 đến 1500 NCU /g vải

Các enzym được dùng dưới dạng đơn vị hoạt tính xenlulaza trung tính (NCU) cho mỗi lượng vải. Hoạt tính enzym được đo dưới dạng mức giải phóng của đường khử ra khỏi carboxymetylxenluloza (3% CMC) ở nhiệt độ 50°C trong 50 mM Hepes dung dịch đệm pH=7,0 (NCU hoạt tính Haakana *et al.* 2004). Các protein Cel45 tái tổ hợp được dùng với liều lượng 1250 NCU/g vải, Ecoston[®]N400 1500 NCU/g vải và Denimax™ 399S 250 NCU/g. Dùng liều của mỗi enzym là đủ để tạo ra mức chênh lệch có thể đo được/phát hiện được một cách dễ dàng (mức tăng nhẹ = $\Delta L^* > 2$ đơn vị) ở toàn bộ khoảng nhiệt độ. Các enzym được làm bất hoạt sau khi xả nước bởi việc nâng độ pH trên 11 bằng cách bổ sung 4,2 g NaOH (10 phút, 40°C) và giữ ba lần. Vải bò được làm khô trong thùng quay.

Tác dụng mài mòn sinh học/mức độ mài mòn vật liệu thử nghiệm chính được đánh giá bằng cách đo màu dưới dạng các hệ số phản xạ bằng phổ quang kế Minolta CM 2500 bằng cách sử dụng các tọa độ không gian màu $L^*a^*b^*$ (nguồn sáng D65/2°). Màu sắc từ mặt trước và mặt sau của vải bông chéo được đo sau khi rửa hồ (tức là trước khi xử lý bằng xenlulaza) và sau khi xử lý bằng xenlulaza. Mỗi giá trị đo trên

mặt trước của vải bông chéo là giá trị trung bình của 40 lần đo. Profin nhiệt độ trong ứng dụng vải bông chéo cũng được minh họa bằng cách tính toán tính năng tương đối (%) ở nhiệt độ 30°C so với 50°C (tỷ lệ 30:50) và tính năng tương đối (%) ở nhiệt độ 40°C so với nhiệt độ tối ưu (tỷ lệ 40/OT). Các kết quả được thể hiện trong các bảng từ 12 đến 14 và Fig.3.

Bảng 12. Profin nhiệt độ của chế phẩm Cel45 trong xử lý vải bông chéo. Xử lý bằng chế phẩm enzyme Cel45 thương phẩm được sử dụng để so sánh.

Enzym	Nhiệt độ(°C)	Mức tăng tương đối của L* (%)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	60	54
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	50	95
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	40	100
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	30	93
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	20	65
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	60	99
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	50	100
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	40	81
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	30	74
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	50	96
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	40	100
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	30	76
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	20	62
Ecostone® N400	60	100
Ecostone® N400	50	91
Ecostone® N400	40	75
Ecostone® N400	30	64
Denimax™ 399S	60	100
Denimax™ 399S	50	92
Denimax™ 399S	40	62
Denimax™ 399S	30	40

Bảng 13. Các tỷ lệ 30:50 và 40:OT được tính toán từ profin nhiệt độ của các enzym Cel45 mới và các chế phẩm Cel45 loại thương phẩm

Enzym	Tỷ lệ 30:50 (%)	Tỷ lệ 40:OT (%)
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	98	100
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	74	81
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	79	100
Ecoston [®] N400	70	75
Denimax [™] 399S	43	62

Các kết quả trong bảng 12 và Fig.3 cho thấy rằng các enzym Cel45 tái tổ hợp mới có profin nhiệt độ thấp hơn trong ứng dụng so với các enzym Cel45 thương phẩm Ecoston[®]N400 và Denimax[™] 399S. *Gp*_RF6293_Cel45A cho thấy tính năng tối ưu ở khoảng nhiệt độ rất rộng từ 30 đến 50°C, điều này là đáng ngạc nhiên, vì nhiệt độ tối ưu ở các điều kiện phân tích là cao hơn một cách đáng kể (từ 55 đến 60°C, Fig.2B). Khoảng nhiệt độ tối ưu đối với *Gp*_RF6546_Cel45A và *Fe*_RF6318_Cel45A cũng thấp hơn đối với các enzym thương phẩm.

Cả *Gp*_RF6293_Cel45A lẫn *Fe*_RF6318_Cel45A đều có tính năng cao hơn ở nhiệt độ 40°C so với ở nhiệt độ 50°C, là đặc tính độc đáo so với các enzym khác thuộc họ Cel45, như các chế phẩm thương phẩm được sử dụng làm chế phẩm tham chiếu, và thường làm việc tốt ở nhiệt độ từ 50 đến 60°C. Các kết quả trong bảng 13 cho thấy rằng cả tỷ lệ 30/50 lẫn 40/OT là có lợi hơn với các endoglucanaza mới so với các chế phẩm Cel45 loại thương phẩm.

Các kết quả trong bảng 14 cho thấy rằng với enzym *Gp*_RF6293_Cel45A tái tổ hợp, hiệu quả mài mòn sinh học/mài mòn cao hơn ở nhiệt độ thấp (30°C) có thể thu được so với các enzym Cel45 thương phẩm.

Bảng 14. Đo màu mặt trước của vải bông chéo được xử lý bằng chế phẩm *Gp_RF6293_Cel45A* ở nhiệt độ 30°C và độ pH=6 . Xử lý bằng chế phẩm enzym thương phẩm được sử dụng để so sánh. L* biểu thị độ sáng.

Enzym	Hoạt tính/g hàng may mặc	Trước khi xử lý bằng xenlulaza	Sau khi xử lý bằng xenlulaza	Mức tăng L*
		L*	L*	
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	1250 NCU/g	16,87	22,19	5,32
Ecostone® N400	1500 NCU/g	16,95	21,75	4,80
Denimax™ 399S	250 NCU/g	16,82	19,29	2,47
Denimax™ 399S	1250 NCU/g	16,82	21,36	4,54

Ví dụ 5. Tính năng của các protein Cel45 tái tổ hợp trong xử lý vải bông chéo ở độ pH khác nhau

Các protein Cel45 tái tổ hợp được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 3 bằng cách sử dụng *Trichoderma* làm vật chủ được thử nghiệm đối với hiệu quả của chúng trong mài mòn sinh học vải bông chéo ở độ pH khác nhau để tạo ra kiểu mài tương tự với kiểu mài bằng đá bọt.

Hệ thử nghiệm đối với mài mòn sinh học là như được nêu trong Ví dụ 4, chỉ khác là mẻ vải bỏ khác nhau được sử dụng và nhiệt độ là 40°C và độ pH từ 5 đến 7. Ngoài ra, tác dụng của việc xử lý bằng xenlulaza được đánh giá như nêu trong Ví dụ 4.

Các kết quả được nêu trong Bảng 15 và Fig.4 cho thấy rằng khoảng pH tối ưu đối với *Gp_RF6293_Cel45A* là từ 5 đến 6,5 và đối với *Fe_RF6318_Cel45A* là từ 6 đến 6,5.

Bảng 15. Đo màu mặt trước của vải bông chéo được xử lý bằng chế phẩm Cel45 tái tổ hợp ở các độ pH khác nhau, ở nhiệt độ 40°C. L* biểu thị độ sáng

Enzym	Độ pH	Trước khi xử lý bằng xenlulaza	Sau khi xử lý bằng xenlulaza	Mức tăng L*
		L*	L*	
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	5	16,70	22,33	5,63
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	6	16,63	22,36	5,73
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	6,5	16,75	22,2	5,45
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	7	16,75	21,16	4,41

Fe_RF6318_Cel45A	5	16,55	19,5	2,95
Fe_RF6318_Cel45A	6	16,53	20,66	4,13
Fe_RF6318_Cel45A	6,5	16,47	20,22	3,75
Fe_RF6318_Cel45A	7	16,53	19,92	3,39

Ví dụ 6. Tính năng của các protein Cel45 tái tổ hợp trong xử lý hoàn thiện sinh học (loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ lông/loại bỏ xơ xù)

Khả năng của các protein Cel45 tái tổ hợp được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 3 sử dụng *Trichoderma* làm vật chủ được thử nghiệm trong loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn của hàng dệt kim cotton và được so sánh với enzym Cel45 có các đặc tính loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn mỹ mãn (WO2006/117432). Việc xử lý bằng xenlulaza được tiến hành với máy giặt vắt Wascator FOM 71 CLS của Electrolux trong những điều kiện đã được mô tả trong bảng 16.

Ba vải nỉ sợi được làm bằng 100% bông (Loại 9761, Orneule, Finland) được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm với vật liệu độn. Vải này đầu tiên được giặt sơ 10 phút ở nhiệt độ 50°C và được giữ 3 lần. Sau khi vải này được xử lý bằng xenlulaza ở nhiệt độ 40°C hoặc 50°C trong thời gian 60 phút. Enzym được dùng dưới dạng đơn vị hoạt tính xenlulaza trung tính (NCU) cho trọng lượng vải. Sau khi xả nước, enzym được làm bất hoạt (trong 10 phút ở nhiệt độ 60°C) bằng cách tăng độ pH trên 11 bằng natri hydroxit. Sau đó, vải này được giặt ba lần và được làm khô trong thùng quay.

Bảng 16. Các điều kiện thử nghiệm/thông số quy trình được sử dụng trong xử lý hoàn thiện sinh học

Thông số quy trình	
Lượng vải	1,0 kg
Nước	15 lít
Điều chỉnh độ pH	bằng axit axetic (80%)
Thời gian	60 phút
Nhiệt độ	40°C/50°C
Liều lượng xenlulaza	250 NCU/g vải

Các mẫu hàng dệt kim được đánh giá bằng mắt để phát hiện mức độ lông bề mặt và xù xơ. Kết quả của mỗi lần đánh giá được định lượng bằng cách chỉ ra kết quả so với thang đo gồm các chuẩn. Các chuẩn này là các mẫu của cùng một loại vải được

giặt bằng các lượng xenlulaza khác nhau và chúng có khoảng cường độ lông bề mặt/xù xơ từ 1 tới 5 với khoảng cách nửa đơn vị. Số 0 là mẫu đối chứng được xử lý mà không có enzym. Số càng cao, thì tác dụng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ lông càng tốt. Số 5 có nghĩa là loại bỏ được lông bề mặt/xù xơ. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 17 và 18. Các kết quả trong các bảng 17 và 18 cho thấy rằng *Gp_RF6293_Cel45A*, *Gp_RF6546_Cel45A* và *Fe_RF6318_Cel45A* có các đặc tính loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn mỹ mãn. Điều đáng ngạc nhiên là *Gp_RF6293_Cel45A* có hiệu quả ở liều lượng hoạt tính thấp hơn nhiều trong loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ lông so với trong xử lý vải bông chéo được nêu trong các ví dụ trước. Cũng đã thấy rằng khoảng pH tối ưu nhất đối với *Gp_RF6293_Cel45A* trong loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn là nằm trong khoảng từ 5,5 đến khoảng 7.

Xenlulaza trung tính có các đặc tính loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn mỹ mãn, như protein *Gp_RF6293_Cel45A*, có khả năng xử lý hoàn thiện sinh học đồng thời với việc nhuộm.

Bảng 17. Các kết quả của việc xử lý hoàn thiện sinh học bằng các protein Cel45 tái tổ hợp ở nhiệt độ 40°C và độ pH=6

Enzym	Hoạt tính/g vải	Đánh giá
Cel45 (WO2006/117432)	250 NCU/g	3,5
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	500 NCU/g	5
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	250 NCU/g	4
<i>Gp_RF6293_Cel45A</i>	125 NCU/g	3

4–5 có nghĩa là tác dụng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ xơ xù mỹ mãn, 3 tác dụng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ xơ xù tốt, 0 là không có tác dụng loại trừ hiện tượng nổi hạt xoắn/loại bỏ xơ xù (xử lý không bằng enzym).

Bảng 18. Các kết quả của xử lý hoàn thiện sinh học bằng các protein Cel45 tái tổ hợp ở nhiệt độ 50°C và độ pH=6

Enzym	g vải	Các điều kiện	Đánh giá
Không chế	0	pH 6, 50°C	0
<i>Gp</i> _RF6293_Cel45A	500 NCU/g	pH 6, 50°C	5
<i>Gp</i> _RF6546_Cel45A	1000 NCU/g	pH 6, 50°C	4
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	1250 NCU/g	pH 6, 50°C	5
<i>Fe</i> _RF6318_Cel45A	625 NCU/g	pH 6, 50°C	4,5

Tài liệu tham khảo

Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Bailey M and Nevalainen H. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. Enzyme Microb. Technol. 3:153-157.

Bendtsen JD, H Nielsen, G von Heijne and S Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol.Biol. 340:783-795.

Gasteiger E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel and A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.

Haakana H, Miettinen-Oinonen A, Joutsjoki V, Mäntylä A, Suominen P and Vehmaanperä J. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol. 34:159-167.

Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316.

Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293: 781-788.

Henrissat B. and Bairoch A. (1996).Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316: 695-696.

Joutsjoki, VV, TK Torkkeli and KMH Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24:223-228.

Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.

Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C and Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. Gene 15:147-156.

Needleman S. and Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology 48, 443-453.

Nielsen H, J Engelbrecht, S Brunak and G von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6.

Nierstrasz V.A. and Warmoeskerken M.M.C.G. (2003) Process engineering and industrial enzyme applications. In: Textile processing with enzymes. A.Cavaco-Paulo and G.M.Gübitz (eds.) Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. pp.120-157.

Rice P, Longden I and Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics 16:276-277.

Paloheimo M, A Mäntylä, J Kallio, and P Suominen. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Env. Microbiol. 69:7073-7082.

Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen and J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61:155-164.

Raeder U and P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20.

Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

Sambrook J and DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

Van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, McBride JE. 2007 Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. Adv Biochem Eng Biotechnol.;108:205-35.

Giải thích trình tự

SEQ ID NO:	Các trình tự
1	Đoạn mồi oligonucleotit Cel45_S1
2	Đoạn mồi oligonucleotit Cel45_S2
3	Đoạn mồi oligonucleotit Cel45_AS1
4	Đoạn mồi oligonucleotit Cel45_AS2
5	Đoạn mồi oligonucleotit Cel45_AS3
6	Đoạn PCR thu được từ <i>G. pannorum</i> RF6293 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
7	Đoạn PCR thu được từ <i>G. pannorum</i> RF6289 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
8	Đoạn PCR thu được từ <i>F. cf. equiseti</i> RF6318 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
9	Đoạn PCR thu được từ <i>F. cf. equiseti</i> RF6546 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
10	Đoạn PCR thu được từ <i>G. pannorum</i> RF6608 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
11	Đoạn PCR thu được từ <i>G. pannorum</i> RF6608 bằng cách sử dụng các đoạn mồi Cel45_S1 và Cel45_AS3
12	Trình tự nucleotit của gen <i>G. pannorum</i> RF6293 cel45A
13	Được suy trình tự axit amin của <i>G. pannorum</i> RF6293 Cel45A
14	Trình tự nucleotit của gen <i>G. pannorum</i> RF6293 cel45B
15	Được suy trình tự axit amin của <i>G. pannorum</i> RF6293 Cel45B
16	Trình tự nucleotit của gen <i>F. cf. equiseti</i> RF6318 cel45A
17	Được suy trình tự axit amin của <i>F. cf. equiseti</i> RF6318 Cel45A
18	Trình tự nucleotit của gen <i>G. pannorum</i> RF6546 cel45A
19	Được suy trình tự axit amin của <i>G. pannorum</i> RF6546 Cel45A

20	Trình tự nucleotit của gen <i>G. pannorum</i> RF6608 cel45A
21	Được suy trình tự axit amin của <i>G. pannorum</i> RF6608 Cel45A
22	Trình tự nucleotit của gen <i>G. pannorum</i> RF6608 cel45B
23	Được suy trình tự axit amin của <i>G. pannorum</i> RF6608 Cel45B

Thông tin về vi sinh vật được nộp lưu

Giống nộp lưu	Bộ sưu tập giống	Ngày nộp lưu	Số nộp lưu
<i>Geomyces pannorum</i> RF6293	1)	7/4/2006	CBS 119567
<i>Fusarium cf. equiseti</i> RF6318	1)	7/4/2006	CBS 119568
<i>Geomyces pannorum</i> RF6546	1)	16/6/2006	CBS 119958
<i>Geomyces pannorum</i> RF6608	1)	16/6/2006	CBS 119962
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2206	2)	10/1/2007	DSM 18916
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2221	2)	16/3/2007	DSM 19171
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2226	2)	16/3/2007	DSM 19173
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2208	2)	10/1/2007	DSM 18915
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2207	2)	10/1/2007	DSM 18917
Chủng <i>E. coli</i> chứa plasmit pALK2219	2)	16/1/2007	DSM 19170

1) Centraalbureau Voor Schimmelcultures at Upsalalaan 8, 3508 AD, Utrecht, the Netherlands

2) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Germany.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit endoglucanaza của nấm phân lập được, trong đó polypeptit này thuộc họ glycosyl hydrolaza 45, thể hiện hoạt tính đáng kể ở nhiệt độ thấp, và bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 hoặc 23.
2. Polypeptit endoglucanaza theo điểm 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 hoặc 23.
3. Polypeptit endoglucanaza theo điểm 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 98% so với SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 hoặc 23.
4. Polypeptit endoglucanaza theo điểm 1, trong đó polypeptit này thu được hoặc có nguồn gốc từ các giống *Geomyces pannorum* RF 6293 có số nộp lưu CBS 119567, RF6546 có số nộp lưu CBS 119958 hoặc RF6608 có số nộp lưu CBS 119962, hoặc giống *Fusarium cf equiseti* RF6318 có số nộp lưu CBS 119568.
5. Polynucleotit phân lập, trong đó polynucleotit này được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) trình tự nucleotit có SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20 hoặc 22,
 - b) sợi bổ trợ của a), và
 - c) trình tự thoái hóa do mã di truyền thành trình tự bất kỳ trong số các trình tự a) hoặc b).
6. Polynucleotit theo điểm 5, trong đó polynucleotit này được mang bởi *E. coli* DSM 18916, DSM 19171, DSM 19173, DSM 18915, DSM 18917 hoặc DSM 19170.
7. Vector biểu hiện, trong đó vector này bao gồm polynucleotit theo điểm 5.
8. Tế bào chủ, trong đó tế bào này bao gồm vector biểu hiện theo điểm 7.
9. Phương pháp sản xuất polypeptit endoglucanaza theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước biến nạp tế bào chủ với vector biểu hiện mã hóa polypeptit nêu trên, và nuôi cấy tế bào chủ này trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit nêu trên, và tùy ý thu hồi và tinh chế polypeptit nêu trên.

10. Chế phẩm enzym, trong đó chế phẩm này chứa polypeptit endoglucanaza theo điểm 1.
11. Quy trình xử lý vật liệu xenluloza, trong đó quy trình này bao gồm bước cho vật liệu xenluloza tiếp xúc với polypeptit endoglucanaza theo điểm 1, hoặc chế phẩm enzym theo điểm 10.
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này được tiến hành ở nhiệt độ $\leq 50^{\circ}\text{C}$.
13. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9.
14. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này là quy trình mài mòn sinh học hoặc xử lý hoàn thiện sinh học.
15. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này là quy trình thủy phân vật liệu lignoxenluloza hoặc xử lý thực phẩm.
16. Hỗn hợp tẩy rửa, trong đó hỗn hợp tẩy rửa này chứa polypeptit endoglucanaza theo điểm 1 hoặc chế phẩm enzym theo điểm 10.
17. Thức ăn chăn nuôi, trong đó thức ăn chăn nuôi này chứa polypeptit endoglucanaza theo điểm 1 hoặc chế phẩm enzym theo điểm 10.
18. Chúng *E. coli* có số nộp lưu DSM 18916, DSM 19171, DSM 19173, DSM 18915, DSM 18917 hoặc DSM 19170.
19. Quy trình theo điểm 11, trong đó quy trình này được tiến hành ở nhiệt độ $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
20. Quy trình theo điểm 13, trong đó quy trình này được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 8.
21. Quy trình theo điểm 13, trong đó quy trình này được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6,5.

Fig. 1

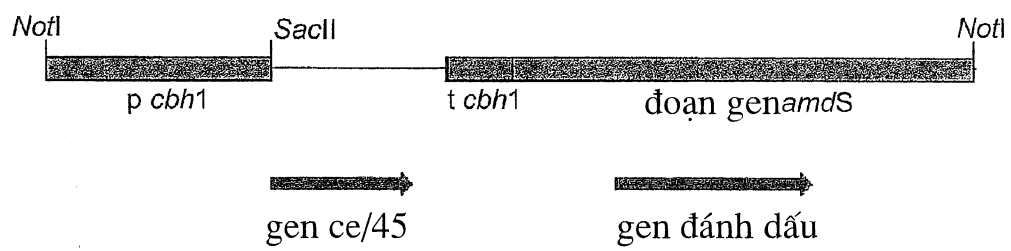
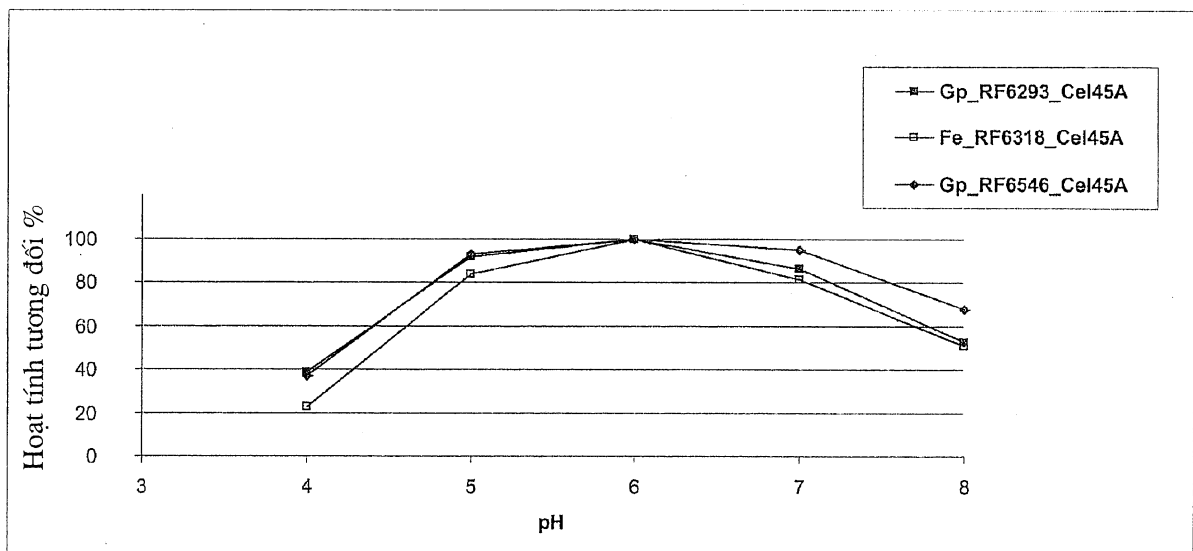


Fig. 2

A)



B)

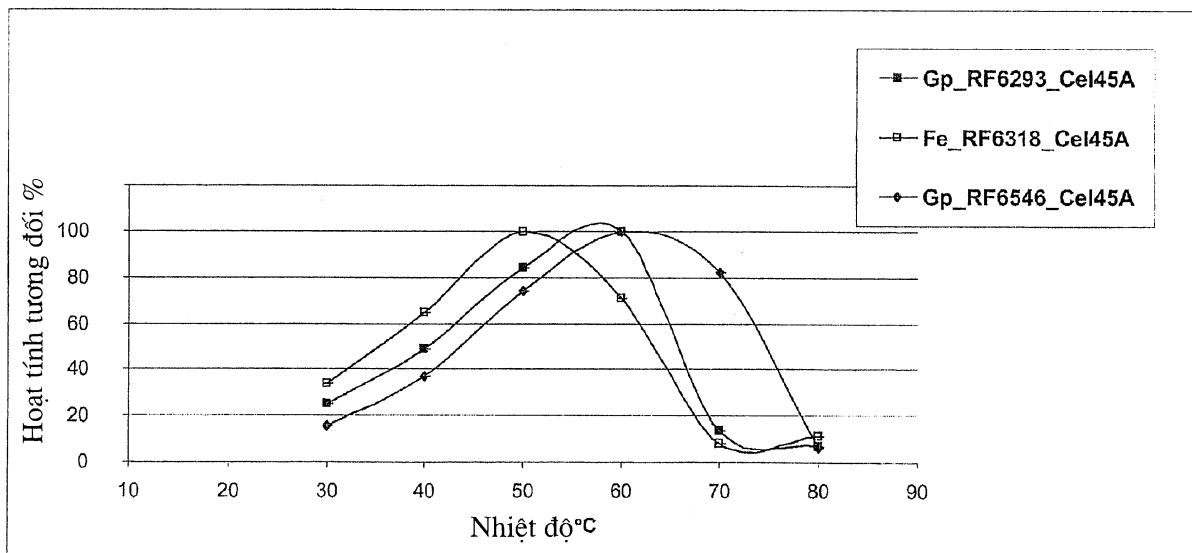


Fig. 3

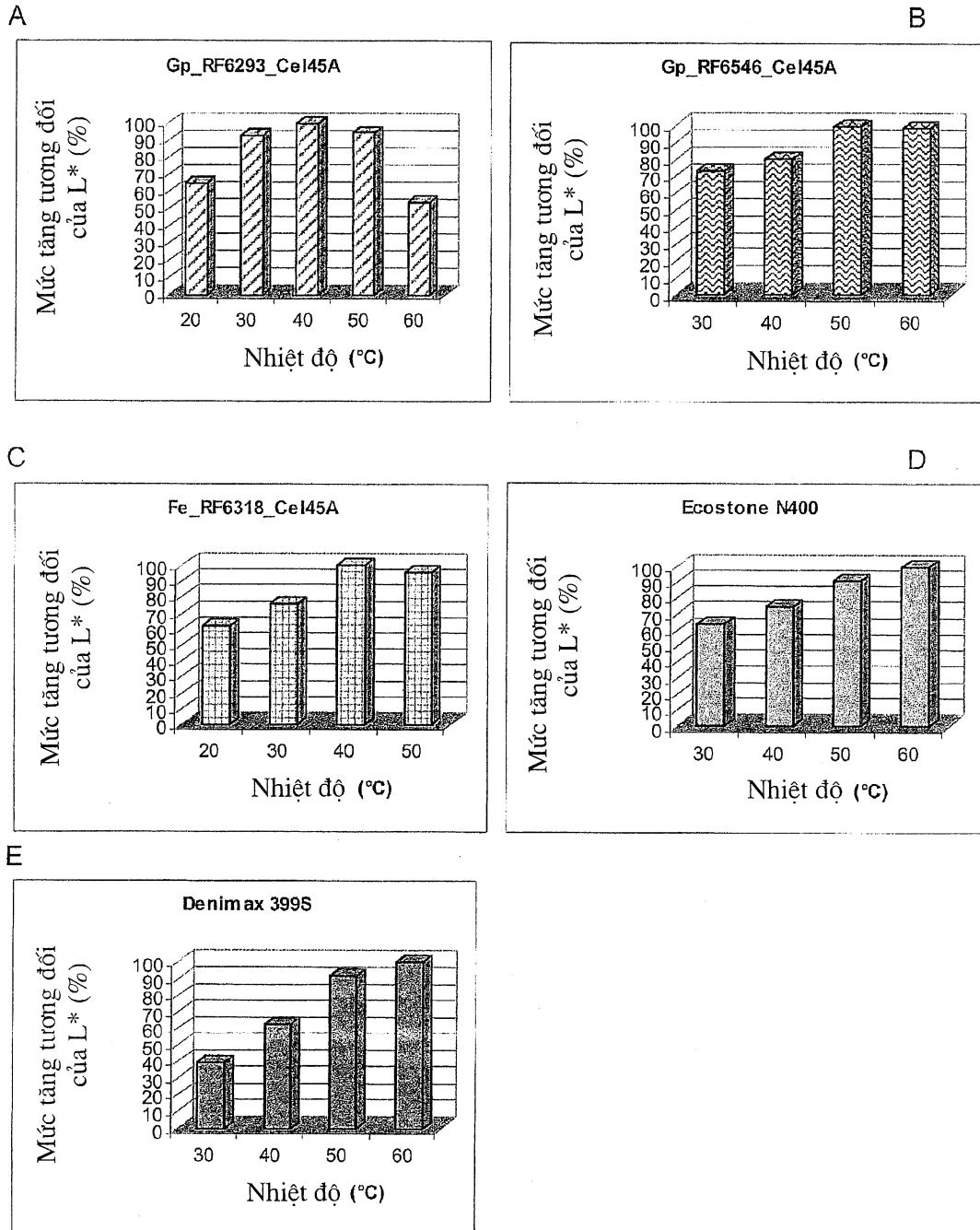


Fig. 4A

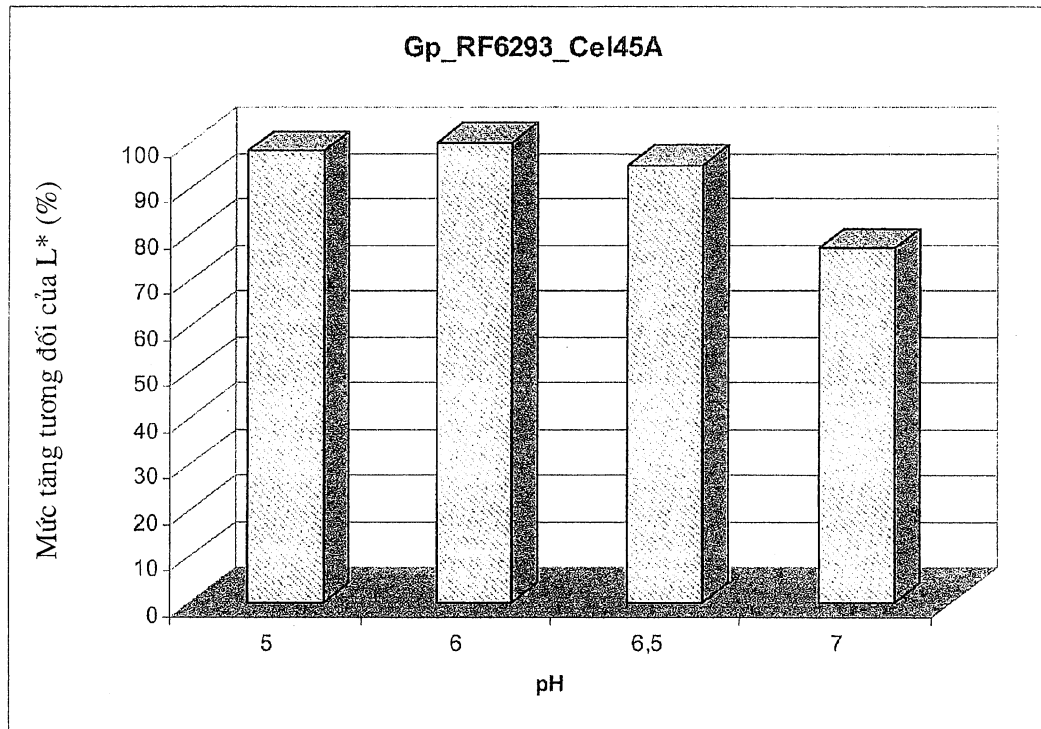


Fig. 4B

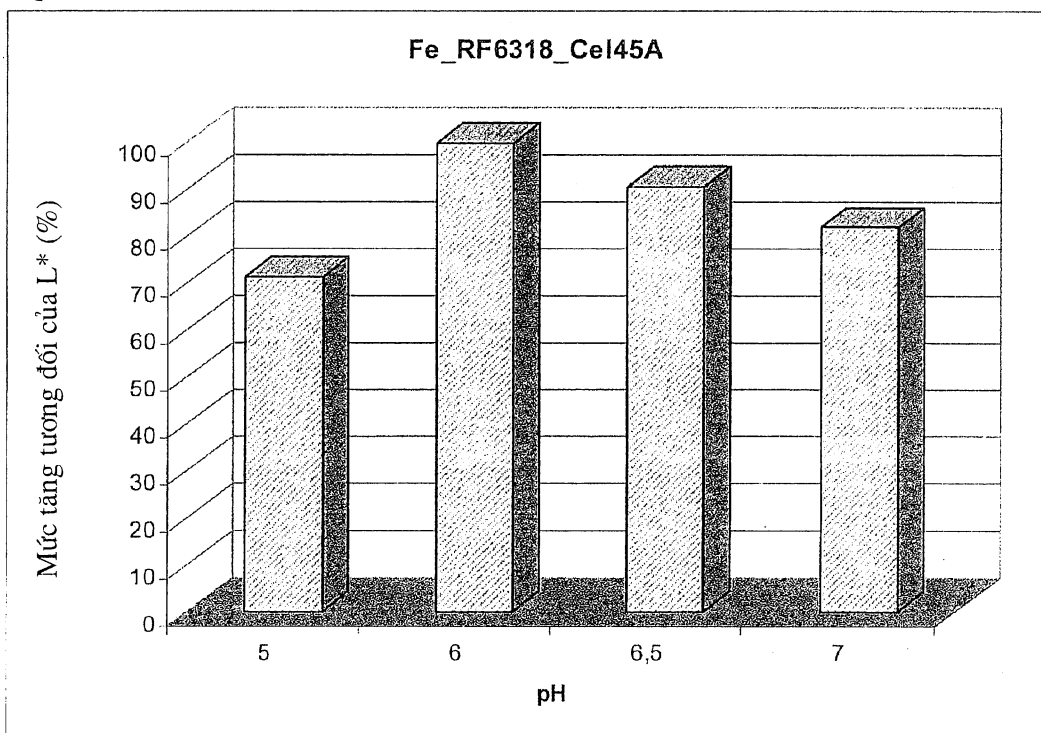
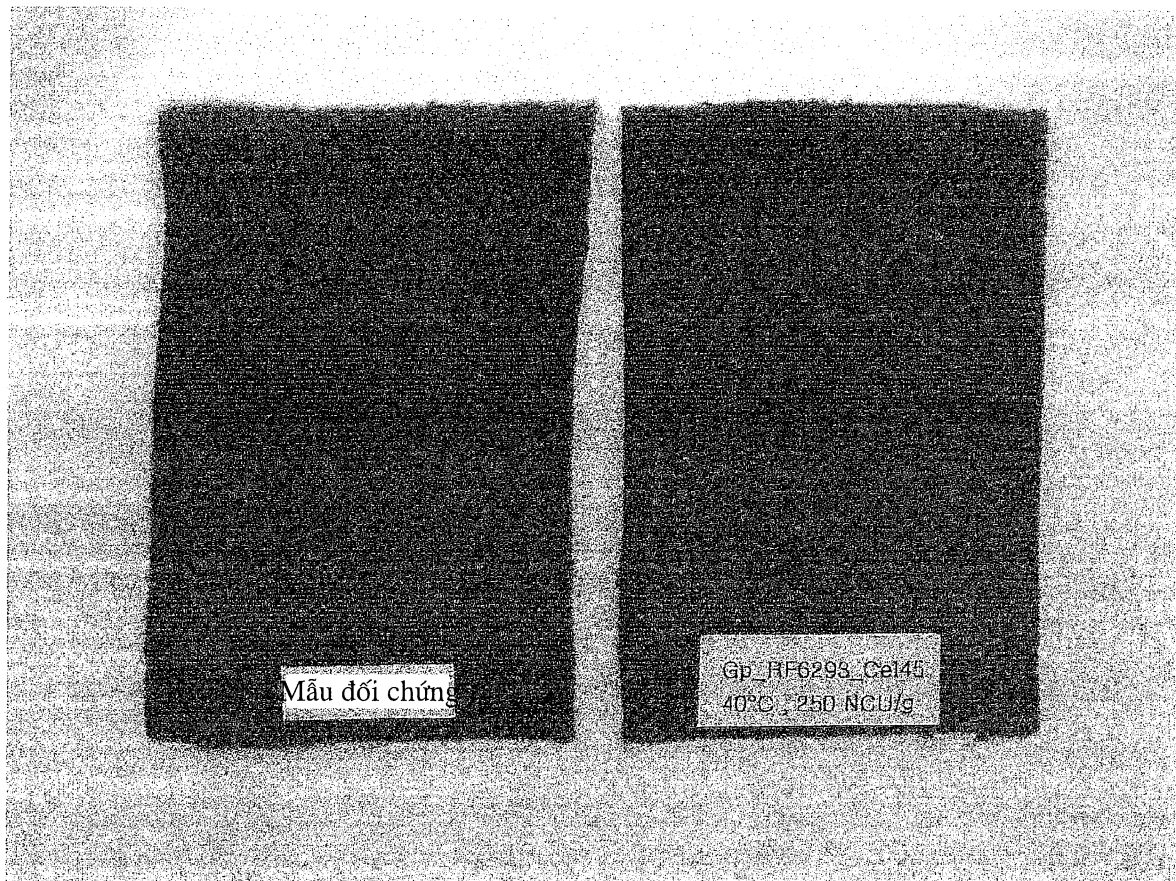


Fig. 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	AB Enzymes Oy	
<120>	POLYPEPTIT ENDOGLUCANAZA CỦA NẤM, CHẾ PHẨM ENZYM, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ QUY TRÌNH XỬ LÝ VẬT LIỆU XENLULOZA	
<130>	2081228PC	
<160>	23	
<170>	PatentIn phiên bản 3.3	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	1	
	taytgggayt gytgyaarcc	20
<210>	2	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<220>		
<221>	dấu hiệu misc	
<222>	(12)..(12)	
<223>	n là a, c, g, hoặc t	
<400>	2	
	tggtygtgyg cntgyta	17
<210>	3	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<220>		
<221>	dấu hiệu misc	
<222>	(6)..(6)	
<223>	n là a, c, g, hoặc t	
<400>	3	
	tarcangrc arcacca	17

<210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (6)..(6)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 4
 gtrcancrrt craadat 17

<210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 5
 ttrtcsgrt tytgraacca rtc 23

<210> 6
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum

<400> 6
 tactgggact gctgcaaacc ctctcgcc tggtcaggca aggcctcatt caaaaccggt 60
 cccgtgcagt cctgtgaaa gggcgacaat gtgctcgag acgcagacac caagtccgca 120
 tgcgacaacg gtggcccagc ctttatgtgc tccgatgaga gcccatgggc cgtctcagac 180
 agcctggcct atggattcgc tgcggtgtcc atatcgggtg gcactgaggc gagctggtgc 240
 tgtgcttgct acgagttgac gttcacgagc ggcccagtgt caggcaagaa gatggtcgtg 300
 caggcgaaa atacgggtgg tgaccttggc cagaatcact ttgatatcgg cgtacgtata 360
 ccgtttctgt cctcgtcttt cttctttcta cccctcgagc tcccttcaca tcccctctcc 420
 atcagctcct acacctcatt tatataagaa tccctcaact aaccaccacc agatgcccgg 480
 cggcggttc ggctcttca acgcctgcac tcccgaatac ggcacgcctt ccacgggctg 540
 gggaaatcaa tacggcgcc tcacctcgcg gagccaatgc gacgccttcc cccaggccct 600
 caaagccggt tgctactgga gggtcgactg gttccaaaac gccgcaca 648

<210> 7
 <211> 588

<212> ADN

<213> *Geomyces pannorum*

<400> 7

tattgggatt gttgtaagcc gtcctgcggc tgggccgaca aagcagactt cgtcgacaag	60
tctccagtcc aatcatgcca tatcaacgca aatccgctgc tggatgttac tcaggggacc	120
ggttgcaatg gcggcaatgc gttcggatgt gcgtcgaact cgccgtgggc cgtcaatgac	180
acgttctcct acggcttcgt gggcactttc ctcatggcg gcgacgagtc cagctgggtgc	240
tgcagctgct tccaattgaa ctttaccagc ggggcagtca aaggcaaatac gatgattgtg	300
caggcctcca acacgaatta cgattctcca gacgcgaatg tcttcactct tgggtgatgt	360
actcctttcc ccgcagattg ggagttacgc ccgtactaat gccttctatc agatacctgg	420
tggaaataca agctatgctg gcgcttgctg tatcgaatac aacgtctcag attctgtgtt	480
cggcacggaa aacgtgggcg tatctaatac caccgactgt gatgaccttc ccgcagcact	540
gaagcctggg tgccagtggc ggttcgactg gttccagaat gcggataa	588

<210> 8

<211> 579

<212> ADN

<213> *Fusarium cf. equiseti*

<400> 8

tactgggact gctgcaaacc ttcttgctct tggggcgcca aggctaaagt caacgctccc	60
gctctgactt gtgacaacaa ggacaacccc atcaccaaca ccaactctgt caacgggtgt	120
gagggtgccg gttctgctta tgcttgccac aactactctc cttggggcgt caacgacgat	180
cttgtctatg gtttactgc tactaagctt gctgggtggc ccgaggccag ctgggtgctgt	240
gcttggtatg cgtatgtctc agtcgctctg atacatcatc ccgtgttttc atgctaactg	300
tatctctctc agtctcacct ttacgaccgg tccagtgaag ggcaagaaga tgattgtcca	360
gtccaccaac actggaggcg atcttggtga caaccacttc gatcttatga tgcccggcgg	420
cggagtcggt atcttcgacg gatgcacctc tcagttcgga aaggcccttg gtgggtgctca	480
gtacggcggc atctctctc gaagcgaatg tgatagcttc cccgagctgc tcaaggatgg	540
gtgccactgg cgatttgact ggttccaaaa cgccgataa	579

<210> 9

<211> 638

<212> ADN

<213> *Geomyces pannorum*

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (450) .. (450)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 9

tactgggact gctgcaaacc gtcttgccgc tggacaggca aggccaccct caccagcggc	60
cccgtgcagt cctgtgacaa gaacgacaac gtgctcgag acccagccac caagtccgca	120
tgcgacaatg gtggcccggc gttcatgtgc tcgaatgaga gtccgtgggc cgtctcggac	180
agtttgccgt atggatacgc cgcggtgtcg attgcgggtg gaacggaggc gagctggtgc	240
tgtgcttgct acgagttgac gtttacgagc ggcccgggtg cgggcaagaa gatgattgtg	300
caggcgacta atacgggtgg tgatcttggc cagaatcact tcgatatcgg cgtgcgtatt	360
ccatttccct cgcccctttc tacccttaa ctttctttca atactccttc ccaccagctt	420
ctgaaccgca tttatataag aatcacccan ctaacacccc ccagatgccg ggcggcggct	480
tcggcatctt caacgcctgc acccccctaat acggcacccc ctccgccggc tggggcgccc	540
aatacggcgg catctcttcc cgcagccaat gcgacgcctt ccctgagaaa ctcaaggcgg	600
gatgctactg gcgcttcgac tggtttcaaa acgccgat	638

<210> 10

<211> 636

<212> ADN

<213> *Geomyces pannorum*

<400> 10

tactgggact gctgcaaacc gtcctgcgcc tggacaggca aggcctcctt gacgagcggc	60
cccgtgcagg cctgtgacaa gaacgacaac gtgctcgccg acgagatac caagtccgcc	120
tgcgacaacg gcggcccagc ctacatgtgc tctgatgaga gccatgggc cgtctcggac	180
agcctggcgt atggatacgc cgcggtgtcg atcgcgggcg ggacggaggc gagctggtgc	240
tgtgcctgct acgagttgac gtttacgagc ggcccgggtg ctggcaagaa gatgatcgtg	300
caggcgacga atacgggtgg tgaccttggc cagaatcaat tcgatctcgg cgtgcgtata	360
ccattcctcc ctcttcccc tcgaacgtcc cttcgcattc cccctccac cagttcctac	420
acctaattta cacacgaatt cccccccact aacgccccct agatgcccgg cggcggcttc	480
ggcctcttca acgcctgcac cccccagtag ggcaacgcct ccaccggctg gggcgcccaa	540
taaggcggta tctctcgcg gagccagtgc gacgccttcc ccacggccct caaagccggc	600
tgctactggc gcttcgactg gttccagaac gcggac	636

<210> 11

<211> 590

<212> ADN

<213> *Geomyces pannorum*

<400> 11

tactgggact gctgcaaacc gtcctgcggc tgggcccagaca aagcagactt cgtcgacaag	60
tctccagtcc aatcatgcga taaaaacgca aatccgctgc tagataattc ccaggggact	120
ggttgcaatg gcggcaatgc tttcggatgt gcgtcaaact cgccgtgggc cgttaatgac	180
acgtttctct acggcttcgt gggcactttc ctcgttggcg gcgacgagtc tagctggtgc	240
tgtagctgct accaattgaa ctttaccagc ggggcagtca agggcaaatac aatgattgtg	300
caagcctcga acacgaatta cgattccccg aacgcgaatg tctttactct tgggtgtacgt	360
tgctcattct tccccagagc gagcgagtca cggccgtact aatgccattt atcagatacc	420
tgggtgggaat actagctacg ctggcgcgctg tgctctcgaa tacagtgtcc caaattctgt	480
gttcggcacg gaaaatgtgg gcgtgtcaaa tcgcaccgac tgtgacaatac ttcccgcagc	540
actgaagcct ggttgccagt ggcgggttcga ctggttccag aatgcggcat	590

<210> 12
 <211> 1036
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum

<220>
 <221> Intron
 <222> (445) .. (565)

<400> 12	
atggctctct ccaagctcac tctcctagcc ctccctccctc tctttctcgc taccacctca	60
ctcgccgcct caggcaatgg gaaaacaacc cgctactggg actggtgcaa gccctcctgc	120
gcctggtcag gcaaggcctc attcaaaacc ggtcccgtgc agtcctgtga caagggcgac	180
aatgtgctcg cagacgcaga caccaagtcc gcatgcgaca acggtggccc agcctttatg	240
tgctccgatg agagcccatg ggccgtctca gacagcctgg cctatggatt cgctgcggtg	300
tccatatcgg gtggcactga ggcgagctgg tgctgtgctt gctacgagtt gacgttcacg	360
agcggcccag tgtcaggcaa gaagatggtc gtgcaggcga caaatacggg tggtgacctt	420
ggccagaatac actttgatat cggcgtagct ataccgtttc tgtcctcgtc tttcttcttt	480
ctaccctcgc acgtcccttc acatccctc tccatcagct cctacacctc atttatataa	540
gaatccctca actaaccacc accagatgcc cggcggcggc ttcggcctct tcaacgcctg	600
cactccccaac tacggcacgc cttccaccgg ctggggaaat caatacggcg gcctcacctc	660
gcggagccaa tgcgacgcct tccccaggc cctcaaagcc ggttgctact ggaggttcga	720
ctgggttcaa aacgcgcgaca acccttcctg cagcttcaag agcgttgctg gtccgctggc	780
cctcacgaat aaatcggggt gtgtccgctc ggatgacacg ccaacgggag atggaaacgt	840
gccaacagct agtggagtgg cccagcgag ctcgacgagt gcggggacga cgacgcctgc	900

gaccggggcca gggacaggag gagcgacagt ggcgaagtat gggcagtgtg ggggggtcggg 960
 gtggacgggg ggaacgggtt gtgcgtctgg ctgcacttgc aaggcgacta accagtggta 1020
 ctgcagtgct ctgtaa 1036

<210> 13
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Geomyces pannorum

<400> 13

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

20641

				245				250				255			
Thr	Thr	Pro	Ser	Thr	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Lys
260				265				270							
Tyr	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Trp	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Cys	Ala
275				280				285							
Ser	Gly	Ser	Thr	Cys	Lys	Ala	Thr	Asn	Gln	Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu
290				295				300							

<210> 14
<211> 966
<212> ADN
<213> Geomyces pannorum

```
<220>
<221> Intron
<222> (475) .. (532)
```

```
<220>
<221> Intron
<222> (715) .. (773)
```

<400>	14						
atgacgaatc	tatcaagatc	cctacgccac	accttcaccc	tctctctctt	tgctctcggt		60
ttctccagtg	ttgatgcgat	atccgacgta	tttgggcggt	ccactgcggt	aacctcgcgg		120
tattgggact	gctgtaagcc	gtcctgcggc	tgggccgaca	aaggagactt	cgtcgacaag		180
tctccagtcc	aatcgtgcga	tatcaacgca	aatccgctgc	tggatgttac	ccaggggacc		240
ggttgcaatg	gcggaatgc	gttcggatgt	gcgtcgaaact	cgccgtgggc	cgtcaatgac		300
acgtttctct	acggcttcgt	gggcactttc	ctcattggcg	gcgacgagtc	cagctggtgc		360
tgacgtgct	tccaattgaa	ctttaccagc	ggggcagtc	aaggcaaatc	gatgattgtg		420
caggcctcca	acacgaatta	cgattcccca	ggcgcgaatg	tcttcactct	tgggtgatgt		480
actcctttct	ccgcagattg	agagttacgc	ccgtactaat	gccttctatc	agatacctgg		540
tggaaataca	agctatgctg	gcgcgtgtgc	tatcgaatac	aacgttccaa	attctgtggt		600
cggcacggaa	aacgtgggcg	tatccaatcg	caccgactgt	gatgactttc	ccgcagcact		660
gaagcctggt	tgccagtggc	ggttcgactg	gttcaaggac	gccgtggagc	caaagtgagt		720
acctatttta	accatttcca	agattcgcgc	gaaatctaac	gtgggaatta	cagtgttgag		780
tataagcgcg	tagcatgtcc	gaaggttctc	acggatatca	cccactgcaa	acgaaacgat		840
gacgatacgg	ttgacgaaga	tgcgatcaag	gcgaattcac	catccgcagc	ttcaacactg		900
tcatcgatgg	gccccacagc	tatcactgtg	ctgtttatgt	ggtggatgct	acaaacgctc		960
ggctaa							966

<210> 15
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Geomyces pannorum

<400> 15

```

Met Thr Asn Leu Ser Arg Ser Leu Arg His Thr Phe Thr Leu Leu Leu
1          5          10          15

Phe Ala Leu Val Phe Ser Ser Val Asp Ala Ile Ser Asp Val Phe Gly
          20          25          30

Pro Ser Thr Ala Val Thr Ser Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser
          35          40          45

Cys Gly Trp Ala Asp Lys Gly Asp Phe Val Asp Lys Ser Pro Val Gln
50          55          60

Ser Cys Asp Ile Asn Ala Asn Pro Leu Leu Asp Val Thr Gln Gly Thr
65          70          75          80

Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ala Phe Gly Cys Ala Ser Asn Ser Pro Trp
          85          90          95

Ala Val Asn Asp Thr Phe Ser Tyr Gly Phe Val Gly Thr Phe Leu Ile
          100          105          110

Gly Gly Asp Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ser Cys Phe Gln Leu Asn Phe
          115          120          125

Thr Ser Gly Ala Val Lys Gly Lys Ser Met Ile Val Gln Ala Ser Asn
130          135          140

Thr Asn Tyr Asp Ser Pro Gly Ala Asn Val Phe Thr Leu Gly Ile Pro
145          150          155          160

Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Gly Ala Cys Ala Ile Glu Tyr Asn Val
          165          170          175

Pro Asn Ser Val Phe Gly Thr Glu Asn Val Gly Val Ser Asn Arg Thr
          180          185          190

Asp Cys Asp Asp Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg
195          200          205

Phe Asp Trp Phe Lys Asp Ala Val Glu Pro Ser Val Glu Tyr Lys Arg
210          215          220

Val Ala Cys Pro Lys Val Leu Thr Asp Ile Thr His Cys Lys Arg Asn
225          230          235          240

Asp Asp Asp Thr Val Asp Glu Asp Ala Ile Lys Ala Asn Ser Pro Ser
          245          250          255

Ala Ala Ser Thr Leu Ser Ser Met Gly Pro Thr Ala Ile Thr Val Leu
          260          265          270

Phe Met Trp Trp Met Leu Gln Thr Leu Gly
275          280

```

<210> 16
 <211> 1162
 <212> ADN
 <213> *Fusarium cf. equiseti*

<220>
 <221> Intron
 <222> (330)..(390)

<400> 16
 atgcggttctt ttgctctcct cgccctagtc ggtcctcttg ccgtgagcgc tgcttctgga 60
 agtggccact ctactcgata ctgggactgc tgcaagcctt cttgctcttg gagcggcaag 120
 gctaaagtca acgctcccgc tctgacttgt gacaacaagg acaaccccat caccaacacc 180
 aactctgtca acggttgtga ggggtggcggg tctgcttatg cttgcaccaa ctactctcct 240
 tgggccgtca acgacgatct tgcctatggg ttactgcta ctaagcttgc tgggtggcacc 300
 gaggccagct ggtgctgtgc ttgttatgcg tatgtctcag tcgctctgat acatcatccc 360
 gtgttttcat gctaactgta tctctctcag tctcaccttt acgaccgggc cagtgaaggg 420
 caagaagatg attgtccagt ccaccaacac tggaggcgat cttggtgaca accacttcga 480
 tcttatgatg cccggcggcg gagtccggtat cttcgacgga tgcacctctc agttcggaaa 540
 ggcccttggg ggtgctcagt acggcggcat ctctctctga agcgaatgtg atagcttccc 600
 cgagctgctc aaggatgggt gccactggcg atttgactgg ttcaagaacg ccgacaaccc 660
 tgacttcacc ttcgagcagg tccagtgcc caaggaactc cttgctatta gtggttgcaa 720
 gcgtgacgac gattccagct tcctgcctt cagtgggaac accacacca gcaaggctaa 780
 gccgagtggg aagaagacta ctgctgctgc tcagcctcag aagaccgagc aggctgtccc 840
 tgttggtcag aagccggctg ctactaagcc cgctccgag cctgtcgttt ccaagcctgc 900
 tgtctccaag cctgcccggc cggacccac caaggttgtc agcaagocca agtcaacctc 960
 aaaagtcggg ggaaccaaga ctcaacaagg ctgccctgcc actaagccaa ccaagccggc 1020
 tgctccccag aagtctgctg tcgctatgta ctaccagtgc ggtgggtcca agtccgccta 1080
 ccccgatggc aacctccctt gcgcttcgg aagcaagtgt gtcaagatga acgattacta 1140
 ctctcagtgt gtccccaact aa 1162

<210> 17
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> *Fusarium cf. equiseti*

<400> 17

Met Arg Ser Phe Ala Leu Leu Ala Leu Val Gly Pro Leu Ala Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
 20 25 30
 Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Lys Val Asn Ala Pro Ala Leu
 35 40 45
 Thr Cys Asp Asn Lys Asp Asn Pro Ile Thr Asn Thr Asn Ser Val Asn
 50 55 60
 Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
 65 70 75 80
 Trp Ala Val Asn Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe Thr Ala Thr Lys Leu
 85 90 95
 Ala Gly Gly Thr Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
 100 105 110
 Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
 115 120 125
 Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
 130 135 140
 Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Gln Phe Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
 165 170 175
 Asp Ser Phe Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
 180 185 190
 Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
 195 200 205
 Cys Pro Lys Glu Leu Leu Ala Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
 210 215 220
 Ser Ser Phe Pro Ala Phe Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ser Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 Pro Ser Gly Lys Lys Thr Thr Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Glu
 245 250 255
 Gln Ala Val Pro Val Val Gln Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Ala Ser
 260 265 270
 Glu Pro Val Val Ser Lys Pro Ala Val Ser Lys Pro Ala Ala Ala Asp
 275 280 285
 Pro Thr Lys Val Val Ser Lys Pro Lys Ser Thr Ser Lys Val Gly Gly
 290 295 300
 Thr Lys Thr His Lys Asp Cys Pro Ala Thr Lys Pro Thr Lys Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Pro Gln Lys Ser Ala Val Ala Met Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser
 325 330 335
 Lys Ser Ala Tyr Pro Asp Gly Asn Leu Pro Cys Ala Ser Gly Ser Lys

	340		345		350								
Cys	Val	Lys	Met	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Val	Pro	Asn
	355						360					365	

<210> 18
 <211> 1028
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum

<220>
 <221> Intron
 <222> (445) .. (557)

<400> 18
 atggctctct ccaaacgcac cctcctcgcc ctctctccct tcttcctagc cgtccctcc 60
 ctgcgcgtct ccggcacagg caaaacaacc cgctactggg actgctgcaa gccgtcttgc 120
 ggctggacag gcaaggccac cctcaccagc ggccccgtgc agtcctgtga caagaacgac 180
 aacgtgctcg cagaccaga caccaagtcc gcatgcgaca atggtggccc ggcgttcatg 240
 tgctcgaatg agagtccgtg ggccgtctcg gacagtttgg cgtatggata cgccgcggtg 300
 tcgattgcgg gtggaacgga ggcgagctgg tgctgtgctt gctacgagtt gacgtttacg 360
 agcggccccg tgtcgggcaa gaagatgatt gtgcaggcga ctaatacggg tggatgatctt 420
 ggccagaatc acttcgatat cggcgtgcgt attccatttc cctcgcccct ttctaccctt 480
 taactttctt tcaatactcc ttcccaccag cttctgaacc gcatttatat aagaatcacc 540
 caactaacac ccccagatg cccggcggcg gcttcggcat cttcaacgcc tgcaccccc 600
 aatacggcac ccctccacc ggctggggcg cccaatacgg cggcatctct tccgcagcc 660
 aatgcgacgc cttccctgag aaactcaagg cgggatgcta ctggcgcttc gactggttcc 720
 agaacgccga caaccctct gtcagcttcc agagcgtcgc ttgcccactg gctattacga 780
 ataaatcagg ctgtgtgcgt gcggatgata agccgacggg ggggtgggacg gtgcccacgg 840
 tgagcggggg tgctcctccg gcgacctcga cgggtccggg gacgacgacg ccatcgagtg 900
 ggacggggaa tgggggggac gtggcgaagt atgcgcagtg tggggggaat ggggtggacgg 960
 gtggtacggt ttgtgaggcg gggctgactt gcaaggctac taatgagtgg tatgcgcagt 1020
 gcctgtaa 1028

<210> 19
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Geomyces pannorum

<400> 19

20641

Met Ala Leu Ser Lys Arg Thr Leu Leu Ala Leu Leu Pro Phe Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala Val Pro Ser Leu Ala Val Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Thr Gly Lys Ala Thr Leu
 35 40 45
 Thr Ser Gly Pro Val Gln Ser Cys Asp Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala
 50 55 60
 Asp Pro Asp Thr Lys Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Pro Ala Phe Met
 65 70 75 80
 Cys Ser Asn Glu Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu Ala Tyr Gly
 85 90 95
 Tyr Ala Ala Val Ser Ile Ala Gly Gly Thr Glu Ala Ser Trp Cys Cys
 100 105 110
 Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys
 115 120 125
 Met Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Gln Asn His
 130 135 140
 Phe Asp Ile Gly Met Pro Gly Gly Gly Phe Gly Ile Phe Asn Ala Cys
 145 150 155 160
 Thr Pro Gln Tyr Gly Thr Pro Ser Thr Gly Trp Gly Ala Gln Tyr Gly
 165 170 175
 Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys
 180 185 190
 Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Phe Gln Ser Val Ala Cys Pro Leu Ala Ile Thr Asn Lys
 210 215 220
 Ser Gly Cys Val Arg Ala Asp Asp Lys Pro Thr Gly Gly Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ser Gly Gly Ala Pro Pro Ala Thr Ser Thr Gly Pro Gly
 245 250 255
 Thr Thr Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Asn Gly Gly Thr Val Ala Lys
 260 265 270
 Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Thr Gly Gly Thr Val Cys Glu
 275 280 285
 Ala Gly Ser Thr Cys Lys Ala Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Gln Cys Leu
 290 295 300

<210> 20
 <211> 1026
 <212> ADN

<213> *Geomyces pannorum*

<220>

<221> Intron

<222> (445) .. (555)

<400> 20

```

atggctctct ccaagctcac ctcctcgcgc ctctctccct tcttcctcgc cgccccctcc      60
ctcgccgtct ccggcactgg ccaaacaacc cgctactggg actgctgcaa gccgtcctgc      120
gcctggacag gcaaggcctc cttgacgagc ggccccgtgc aggcctgtga caagaacgac      180
aacgtgctcg ccgacgcaga taccaagtcc gcctgcgaca acggcggccc agcctacatg      240
tgctctgatg agagcccatg ggccgtctcg gacagcctgg cgtatggata cgccgcggtg      300
tcgatcgcgg gcgggacgga ggcgagctgg tgctgtgcct gctacgagtt gacgtttacg      360
agcggccccg tgtctggcaa gaagatgac gtgcaggcga cgaatacggg tggtgacctt      420
ggccagaatc aattcgatct cggcgtgcgt ataccattcc tccctccttc ccctcgaacg      480
tcccttcgca tccccccctc caccagttcc tacacctaat ttacacacga attccccccc      540
actaacgccc cctagatgcc cggcggcggc ttcggcctct tcaacgcctg cccccccaa      600
tacggcacgc cctccaccgg ctggggcgcc caatacggcg gtatctcctc gcggagccag      660
tgcgacgcct tccccacggc cctcaaagcc ggctgctact ggcgcttcga ctggttccag      720
aacgccgaca acccgaccgt cagcttccag agcgtcgcgt gtccgctggc gctgacgaat      780
aaatcgggct gcgtgcgcgc ggatgatacg ccgacgggga gtgggacggg gtcgacggcg      840
agtgggggag gggcgggtgag ctcgacgagt gcggggacga cgacgccgtc gagcgggacg      900
gggactgggg gtgcgacggg ggcgaagttt gggcagtgtg gggggtcggg gtggacgggg      960
gggacgactt gtgcggctgg atcgacttgc cagggtgaata accagtggta ttgcgagtgc     1020
ttgtaa                                           1026

```

<210> 21

<211> 304

<212> PRT

<213> *Geomyces pannorum*

<400> 21

```

Met Ala Leu Ser Lys Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Pro Phe Phe Leu
1           5           10           15

Ala Ala Pro Ser Leu Ala Val Ser Gly Thr Gly Gln Thr Thr Arg Tyr
          20           25           30

Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Thr Gly Lys Ala Ser Leu
          35           40           45

```

Thr Ser Gly Pro Val Gln Ala Cys Asp Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala
 50 55 60
 Asp Ala Asp Thr Lys Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Pro Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Cys Ser Asp Glu Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu Ala Tyr Gly
 85 90 95
 Tyr Ala Ala Val Ser Ile Ala Gly Gly Thr Glu Ala Ser Trp Cys Cys
 100 105 110
 Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys
 115 120 125
 Met Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Gln Asn Gln
 130 135 140
 Phe Asp Leu Gly Met Pro Gly Gly Gly Phe Gly Leu Phe Asn Ala Cys
 145 150 155 160
 Thr Pro Gln Tyr Gly Thr Pro Ser Thr Gly Trp Gly Ala Gln Tyr Gly
 165 170 175
 Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gln Cys Asp Ala Phe Pro Thr Ala Leu Lys
 180 185 190
 Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro
 195 200 205
 Thr Val Ser Phe Gln Ser Val Ala Cys Pro Leu Ala Leu Thr Asn Lys
 210 215 220
 Ser Gly Cys Val Arg Ala Asp Asp Thr Pro Thr Gly Ser Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Ala Ser Gly Gly Gly Ala Val Ser Ser Thr Ser Ala Gly Thr
 245 250 255
 Thr Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Val Ala Lys
 260 265 270
 Phe Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Trp Thr Gly Gly Thr Thr Cys Ala
 275 280 285
 Ala Gly Ser Thr Cys Gln Val Asn Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 290 295 300

<210> 22
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> Geomyces pannorum

<220>
 <221> Intron
 <222> (475) .. (535)

<220>
 <221> Intron

<222> (718) .. (776)

<400> 22

```

atgacgaatc tatcaaggtc cctacgccac atcttcgccg tcctcctctt tgctctcgtt      60
ttctcctgtg ttgatgctgt gtccgacgtg tttgggccct ccaccgcggt aacatctcgg      120
tattgggact gctgcaagcc gtcttgccgc tggggccgaca aagcagactt cgtcgacaag      180
tctccagtcc aatcatgcga taaaaacgca aatccgctgc tagataattc ccagggggact      240
ggttgcaatg gcggcaatgc tttcggatgt gcgtcaaact cgcctgtgggc cgттаатgac      300
acgttctcct acggcttcgt gggcactttc ctcgttggcg gcgacgagtc tagctgggtg      360
tgtagctgct accaattgaa ctttaccagc ggggcagtca agggcaaate aatgattgtg      420
caagcctcga acacgaatta cgattccccg aacgcgaatg tctttactct tggtgtacgt      480
tgctcattct tccccagagc gagcgagtca cgcctgtact aatgccattt atcagatacc      540
tggtgggaat actagctacg ctggcgctg tgctctcgaa tacagtgtcc caaattctgt      600
gttcggcacg gaaaatgtgg gcgtgtcaaa tcgcaccgac tgtgacaate ttccgcgagc      660
actgaagcct ggttgccagt ggcggttcga ctggttcaag gacactgagg gaccaaagtg      720
agtacctatt ctaaccatt ttaacaatcc cccgttatct aacggtgaaa ttacagtgtc      780
gagtataagc gcgtgacatg cccaaagggt ctacaggata tcaccactg caaacgagag      840
gatgacgaaa gagtcgaaga agatgcgac aaggccaatt caccatctgc ggcttcagca      900
ctgccgtcta tggtccctac agctatctct gcaatattta tgtggtggat gctacaaacg      960
ctcggtga                                     969

```

<210> 23

<211> 282

<212> PRT

<213> Geomyces pannorum

<400> 23

```

Met Thr Asn Leu Ser Arg Ser Leu Arg His Ile Phe Ala Val Leu Leu
1           5           10           15

Phe Ala Leu Val Phe Ser Cys Val Asp Ala Val Ser Asp Val Phe Gly
          20           25           30

Pro Ser Thr Ala Val Thr Ser Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser
          35           40           45

Cys Gly Trp Ala Asp Lys Ala Asp Phe Val Asp Lys Ser Pro Val Gln
          50           55           60

Ser Cys Asp Lys Asn Ala Asn Pro Leu Leu Asp Asn Ser Gln Gly Thr
65           70           75           80

Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ala Phe Gly Cys Ala Ser Asn Ser Pro Trp

```

20641

				85					90					95		
Ala	Val	Asn	Asp	Thr	Phe	Ser	Tyr	Gly	Phe	Val	Gly	Thr	Phe	Leu	Val	
			100					105					110			
Gly	Gly	Asp	Glu	Ser	Ser	Trp	Cys	Cys	Ser	Cys	Tyr	Gln	Leu	Asn	Phe	
		115					120					125				
Thr	Ser	Gly	Ala	Val	Lys	Gly	Lys	Ser	Met	Ile	Val	Gln	Ala	Ser	Asn	
	130					135					140					
Thr	Asn	Tyr	Asp	Ser	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Phe	Thr	Leu	Gly	Ile	Pro	
145					150					155					160	
Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Leu	Glu	Tyr	Ser	Val	
				165					170					175		
Pro	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Thr	Glu	Asn	Val	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Thr	
			180					185					190			
Asp	Cys	Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Gln	Trp	Arg	
		195					200					205				
Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Pro	Ser	Val	Glu	Tyr	Lys	Arg	
	210					215					220					
Val	Thr	Cys	Pro	Lys	Val	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	His	Cys	Lys	Arg	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Asp	Glu	Arg	Val	Glu	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Pro	Ser	
				245					250					255		
Ala	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	Ser	Met	Val	Pro	Thr	Ala	Ile	Ser	Ala	Ile	
			260					265					270			
Phe	Met	Trp	Trp	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly							
		275					280									