



(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)   
**1-0021986**

(51)<sup>7</sup> **A23L 1/0522, A21D 2/18, A23G 3/42, (13) B**  
9/34, A23L 1/16, 1/31, 1/314, 1/317, C12N  
9/44, A23L 1/00, 1/187, 1/212, 1/24, A23D  
8/04, A23L 1/325

---

|                                                                                                          |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| (21) 1-2012-00384                                                                                        | (22) 11.08.2010               |
| (86) PCT/JP2010/005046 11.08.2010                                                                        | (87) WO2011/021372 24.02.2011 |
| (30) 2009-189567 18.08.2009 JP                                                                           |                               |
| (45) 25.10.2019 379                                                                                      | (43) 27.08.2012 293           |
| (73) Glico Nutrition Co., Ltd. (JP)<br>4-6-5, Utajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka Japan 555-8502 |                               |
| (72) ICHIHARA, Takashi (JP), FUKUDA, Junya (JP), KIMURA, Masakazu (JP),<br>KURITA, Kenichi (JP)          |                               |
| (74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)                                    |                               |

---

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC PHẨM CHỨA GEL TINH BỘT VÀ THỰC PHẨM CHỨA GEL TINH BỘT ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột, phương pháp này bao gồm các bước : xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ khoảng từ 10<sup>0</sup>C đến 70<sup>0</sup>C để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym; trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh bột được xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp; gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và làm nguội hỗn hợp chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa nhờ đó gel hóa tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột, trong đó enzym được chọn từ nhóm gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza có đặc tính là có khả năng cải thiện khả năng gel của tinh bột, và cyclodextrin glucanotransferaza. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thực phẩm chứa gel tinh bột được sản xuất bằng phương pháp này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến thực phẩm chứa gel tinh bột, tinh bột có độ nhớt cao và có khả năng tạo gel, thực phẩm chứa tinh bột này, và phương pháp sản xuất chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột bằng cách sử dụng enzym có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Với việc đa dạng hóa thực phẩm, cần có các thực phẩm có nhiều hình dạng, tính chất vật lý và kết cấu khác nhau. Đặc biệt là, gần đây, có sự quan tâm sâu sắc đến cảm giác tan trong miệng và kết cấu là các tính chất vật lý quan trọng cho mục đích thiết kế thực phẩm. Ngoài ra, trong các lĩnh vực có liên quan đến khả năng nuốt mà gần đây đã được quan tâm sâu sắc, kết cấu được nghiên cứu dưới dạng tính chất vật lý quan trọng.

Trong trường hợp thiết kế các thực phẩm đã qua xử lý, việc sử dụng chất gel hóa có vai trò quan trọng là để cải thiện kết cấu và tính chất vật lý, và có thể phát triển các sản phẩm khác nhau theo cách sử dụng.

Để thay đổi tính chất vật lý của thực phẩm, cho đến nay, các chất gel hóa khác nhau đã được bổ sung vào nguyên liệu thực phẩm khi chế biến thực phẩm.

Trong quá trình chế biến thực phẩm, các đại phân tử tự nhiên như aga,



gelatin, gồm gellan, gồm xanthan, gồm hạt đậu locust, caragenan, pectin, natri alginat, gồm hạt me, gồm hạt psyllium, xenluloza vi tinh thể, curdlan, và tinh bột; hoặc các đại phân tử tổng hợp như carboxymetyl xenluloza (CMC) hoặc methyl xenluloza thường được sử dụng làm chất gel hóa.

Trong trường hợp sử dụng các chất gel hóa này, các chất gel hóa đôi khi có thể được sử dụng một mình, tuy nhiên, để tạo gel có nhiều đặc tính khác nhau hơn, chẳng hạn, việc sử dụng hai hoặc nhiều loại chất gel hóa như gồm gellan tự nhiên và gồm guar ở dạng hỗn hợp cũng đã được nghiên cứu và sử dụng (Tài liệu patent 1).

Tuy nhiên, có vài hỗn hợp có thể hiệp đồng làm thay đổi độ bền gel của thực phẩm. Thậm chí nếu có thể hiệp đồng làm thay đổi độ bền gel, thì gel thu được theo cách như vậy không có tính chất vật lý tốt. Việc trộn hai hoặc nhiều loại chất gel hóa thường có nhược điểm là phức tạp và nhiều nguyên liệu rất đắt tiền.

Ngoài ra, có hạn chế khi sử dụng trong chế biến thực phẩm là, ví dụ, gelatin kém bền đối với axit và kiềm, và ngoài ra aga kém bền đối với axit.

Nhiều tính chất vật lý khác nhau đã được tạo ra một cách thành công cho tinh bột bằng cách bổ sung không chỉ tinh bột thô mà cả tinh bột đã qua xử lý thu được bằng cách cải biến hóa học tinh bột (còn được gọi là tinh bột được cải biến hóa học) như tinh bột axetat và tinh bột đơn phosphat để làm chất gel hóa cho nguyên liệu thực phẩm. Ví dụ, các tài liệu patent 2, 3 và 4 đã nêu ra các ví dụ trong đó tinh bột đã tạo liên kết ngang được sử dụng trong bánh mì trắng, bánh kẹo hoặc mì sợi. Tuy nhiên, trong trường hợp tinh bột đã tạo liên kết ngang có mức độ liên kết ngang cao được bổ sung vào thực phẩm, thì độ

cứng và độ nhớt của gel có thể được tăng cường, nhưng có nhược điểm là thành phẩm có kết cấu bở và còn kém về hương vị. Ngoài ra, trong trường hợp tinh bột có mức độ liên kết ngang thấp được bổ sung vào thực phẩm, vì cần phải sử dụng một lượng lớn tinh bột để thu được độ cứng mong muốn, nên thực phẩm thu được có kết cấu bở tăng, do đó làm giảm chất lượng của thành phẩm. Do vậy, việc sử dụng lượng tinh bột có mức độ liên kết ngang thấp bị hạn chế. Ngoài ra, việc xử lý tinh bột bằng cách sử dụng phản ứng hóa học cũng gặp các vấn đề đó là gặp phải các quy định khắt khe đối với phương pháp xử lý và mức độ xử lý sao cho bảo đảm an toàn, và nó thực sự không phù hợp với nhu cầu của người tiêu dùng về độ tin cậy và an toàn.

Để thiết kế các thực phẩm đã qua chế biến này, có nhu cầu cấp thiết là phải phát triển kỹ thuật xử lý để thu được tinh bột đã qua xử lý có các tính chất vật lý khác nhau và có độ an toàn cao.

Bằng các nghiên cứu chuyên sâu, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thực phẩm với độ dẻo cao, cảm giác giòn và các tính chất tương tự có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các bước xử lý các hạt tinh bột bằng enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza trước tiên; sau đó trộn sản phẩm thu được với nguyên liệu thực phẩm và nước; và gia nhiệt hỗn hợp này.

Tinh bột là nguyên liệu được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau và chức năng quan trọng nhất của nó là chức năng làm đặc và chức năng tạo gel. Đặc biệt, trong ngành công nghiệp thực phẩm, chức năng làm đặc và chức năng tạo gel của tinh bột được ứng dụng rộng rãi để tạo hình, tạo ra các tính chất vật lý và kết cấu của thực phẩm. Cấu trúc của tinh bột thay đổi rất nhiều phụ thuộc vào cây trồng tạo ra tinh bột đó (ví dụ, ngô, khoai tây, cây lúa mì, và cây sắn). Do đó, chức năng làm đặc và chức năng tạo gel cũng thay đổi, phụ thuộc vào

cây trồng tạo ra tinh bột đó. Do vậy, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã chọn tinh bột tự nhiên để sử dụng trong một thời gian dài tùy thuộc vào mục đích. Ví dụ, tinh bột lúa mì thường được sử dụng trong sản phẩm patê cá trong một thời gian dài. Nguyên nhân là do tinh bột lúa mì có chức năng tạo gel tuyệt vời. Ví dụ, tinh bột sắn thường được sử dụng trong các thực phẩm cần có độ trong suốt cao và đòi hỏi kết cấu dính. Tuy nhiên, với yêu cầu cải tiến các đặc tính trong ngành công nghiệp thực phẩm hiện nay, không thể giải quyết được yêu cầu này chỉ bằng cách thay đổi tinh bột tự nhiên đã sử dụng. Do vậy, đã phát sinh nhu cầu thay đổi chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel của tinh bột.

Phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để làm thay đổi chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel của tinh bột là cải biến hóa học tinh bột. Đặc biệt, các kỹ thuật áp dụng việc xử lý hóa học, như kỹ thuật đưa điểm liên kết ngang mới vào giữa các phân tử tinh bột bằng cách sử dụng chất liên kết ngang hóa học thích hợp và kỹ thuật đưa vào nhóm chức thích hợp đã được sử dụng rộng rãi để làm thay đổi đáng kể chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel nêu trên. Tuy nhiên, tinh bột đã trải qua việc xử lý hóa học như vậy đã được phân loại là chất phụ gia thực phẩm từ tháng 10 năm 2008 ở Nhật Bản, và do đó, chúng bị hạn chế bởi các quy định của pháp luật. Do vậy, cần có kỹ thuật mà trong đó chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel của tinh bột được thay đổi mà không cần xử lý hóa học.

Kỹ thuật cải biến tinh bột không cần xử lý hóa học bao gồm kỹ thuật xử lý tinh bột bằng enzym. Vì enzym thường tác động lên cơ chất được hòa tan trong nước, nên bước xử lý enzym thường được thực hiện sau khi hòa tan hoàn toàn tinh bột trong nước. Enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza được cho

tác động lên tinh bột đã hòa tan trong nước để phân cắt tinh bột, nhờ đó tạo ra các phân tử có phân tử lượng thấp hơn như dextrin, xi-rô tinh bột, maltooligosacarit, maltoza, và glucoza. Tuy nhiên, trong bước xử lý enzym sử dụng enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza, phân tử tinh bột bị phân cắt để tạo thành các phân tử có phân tử lượng thấp. Do vậy, thường nhận thấy rằng chức năng làm đặc và chức năng tạo gel của phân tử thu được bị giảm đi so với chức năng làm đặc và chức năng tạo gel của tinh bột, hoặc bị mất đi.

Ngoài ra, tài liệu patent 5 bộc lộ một phương pháp thay đổi tính chất vật lý của tinh bột đó là kỹ thuật trong đó enzym được cho tác động đến tinh bột ở dạng các hạt tinh bột trong nước mà không hòa tan chúng trong nước. Tài liệu patent 5 này bộc lộ rằng mặc dù tinh bột thường được hòa tan trong nước trước khi xử lý enzym trong trường hợp xử lý tinh bột bằng enzym, nhưng không nhất thiết phải hòa tan tinh bột trong nước trước khi xử lý enzym, và có thể xử lý bằng enzym các hạt tinh bột, mà không được hòa tan trong nước, nhưng được tạo huyền phù trong nước. Cụ thể, tài liệu này bộc lộ rằng enzym thủy phân như  $\alpha$ -amylaza hoặc glucoamylaza có thể tác động đến các hạt tinh bột không được hòa tan trong nước, nhưng được tạo huyền phù trong nước, và do đó có thể tạo ra đường khử. Tài liệu patent 5 còn bộc lộ rằng kết quả của quá trình này là độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thấp hơn so với độ nhớt của tinh bột không được xử lý bằng enzym. Tuy nhiên, tài liệu patent 5 không gợi ý hoặc bộc lộ rằng tinh bột thu được bằng cách cho enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza tác động đến các hạt tinh bột có chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel được cải thiện so với tinh bột không được xử lý bằng enzym.

Các tài liệu patent từ 6 đến 10 cũng bộc lộ kỹ thuật cho enzym thủy phân tác động đến các hạt tinh bột không tan. Các sáng chế này bộc lộ kỹ thuật

trong đó tác động của enzym thủy phân lên các hạt tinh bột tạo ra các lỗ trên bề mặt của các hạt tinh bột để tạo nên các hạt tinh bột xốp, và các hạt tinh bột xốp này được sử dụng làm nguyên liệu nền dạng bột hoặc chất mang xốp. Tuy nhiên, các tài liệu patent từ 6 đến 10 không gợi ý hoặc bộc lộ rằng tinh bột thu được bằng cách cho phép enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza tác động đến các hạt tinh bột có chức năng làm đặc và chức năng tạo gel được cải thiện. Mục đích của sáng chế là không tạo ra các lỗ trên bề mặt của các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym, và không có mối quan hệ bất kỳ giữa việc cải thiện về chức năng làm đặc và chức năng tạo gel, với việc có tạo ra các lỗ trên bề mặt của các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym hay không. Nếu thực phẩm đã gia nhiệt được tạo ra bằng cách sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế, thì tinh bột đã xử lý bằng enzym sẽ tạo gel cứng trong thực phẩm đã gia nhiệt. Tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể sử dụng được trong thực phẩm đã gia nhiệt. Mặt khác, trong tình trạng kỹ thuật này, điều quan trọng là các lỗ có mặt trên bề mặt của các hạt tinh bột. Nếu các hạt tinh bột sau khi được xử lý bằng enzym được trộn với nước và sau đó được gia nhiệt, thì các hạt tinh bột sẽ bị co rút và trạng thái tạo lỗ của chúng bị mất. Do vậy, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này không xem xét việc sử dụng tinh bột được tạo lỗ theo các giải pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật trong thực phẩm đã gia nhiệt. Theo sáng chế, có thể điều chỉnh độ cứng của gel được tạo thành bằng cách sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym bằng cách điều chỉnh mức độ xử lý enzym. Độ cứng của gel tạo thành ảnh hưởng đến kết cấu, khả năng nhai, và các tính chất tương tự của thực phẩm. Do vậy, việc sử dụng phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra ảnh hưởng đến kết cấu của thực phẩm. Như nêu trên, các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo các giải pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật và

các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym được sử dụng trong đơn này hoàn toàn khác nhau về việc áp dụng và sử dụng.

Như nêu trên, thường không thể tạo ra tinh bột có chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel tuyệt vời mà không tiến hành cải biến tinh bột theo cách hóa học.

Ngoài ra, trong tình trạng kỹ thuật, hoàn toàn chưa có tài liệu nào đề cập đến việc enzym có các đặc tính có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột hay không. Ngoài ra, cũng hoàn toàn chưa phát hiện thấy việc có hay không các lợi ích trong công nghiệp mà có thể thu được từ đặc điểm của enzym có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

Tài liệu kỹ thuật có liên quan

Các tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Công bố patent Nhật Bản số 10-215795

Tài liệu patent 2: Công bố patent Nhật Bản trên công báo số 3723860

Tài liệu patent 3: Công bố patent Nhật Bản trên công báo số 3312225

Tài liệu patent 4: Công bố patent Nhật Bản số 7-63324

Tài liệu patent 5: Công bố patent Nhật Bản số 6-269291

Tài liệu patent 6: Công bố patent Nhật Bản số 2003-219813

Tài liệu patent 7: Công bố patent Nhật Bản trên công báo số 4170062

Tài liệu patent 8: Công bố patent Nhật Bản số 1-159047

Tài liệu patent 9: Công bố patent Nhật Bản số 5-112469

Tài liệu patent 10: Công bố patent Nhật Bản số 8-277230



### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề được sáng chế giải quyết

Sáng chế được dự định để giải quyết các vấn đề nêu trên, và mục đích của sáng chế là đề xuất thực phẩm chứa gel tinh bột có độ cứng mong muốn và phương pháp sản xuất thực phẩm này. Theo phương án cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất tinh bột có chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel tuyệt vời mà không cần tiến hành cải biến hóa học tinh bột này; thực phẩm chứa tinh bột này; và phương pháp sản xuất tinh bột và thực phẩm này.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế này đã nghiên cứu kỹ lưỡng để giải quyết các vấn đề nêu trên và đã phát hiện ra rằng tinh bột có chức năng làm đặc và chức năng tạo gel tuyệt vời thu được bằng cách cho enzym thủy phân đặc hiệu hoặc glycosyltransferaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột tác động đến các hạt tinh bột trong điều kiện trong đó tinh bột không được hòa tan, và do đó, hoàn thành sáng chế dựa trên phát hiện này. Thường nhận thấy rằng khi enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza được cho tác động lên tinh bột, tinh bột bị phân cắt để tạo thành các phân tử nhỏ hơn, và do vậy độ nhớt và khả năng tạo gel của phân tử thu được giảm so với độ nhớt và khả năng tạo gel của tinh bột trước khi xử lý bằng enzym, hoặc bị mất đi. Trên thực tế, khi enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza giống như enzym thủy phân hoặc glycosyltransferaza có khả năng tạo ra tinh bột tuyệt vời như vậy, khi được cho tác động đến các hạt tinh bột trong điều kiện trong đó tinh bột không được hòa tan trong nước, được cho tác động lên tinh bột sau khi hòa tan tinh bột trong nước, độ nhớt của tinh bột giảm, và do đó, không thể thu được tinh

bột có chức năng làm đặc hoặc chức năng tạo gel tuyệt vời. Như nêu trên, sáng chế không thể được hình thành từ kiến thức chung thông thường và sự hiểu biết kỹ thuật chung thông thường của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Điều kiện xử lý enzym các hạt tinh bột có thể thay đổi phụ thuộc vào tính đặc hiệu của enzym và nguồn gốc của các hạt tinh bột. Ví dụ, trước tiên, các hạt tinh bột được tạo huyền phù trong nước trao đổi ion hoặc dung dịch đệm để tạo ra huyền phù tinh bột. Trong trường hợp cần phải điều chỉnh độ pH của huyền phù tinh bột này, độ pH được điều chỉnh đến độ pH tối ưu của enzym. Khi làm ấm huyền phù tinh bột này đến nhiệt độ mà tại đó các hạt tinh bột không bị phân giải (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C), enzym được bổ sung và phản ứng có thể được tiến hành, ví dụ, trong khoảng 24 giờ (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 20 giờ). Sau đó, enzym và hydratecarbon được rửa giải bằng cách thủy phân bằng enzym được loại bỏ bằng bước rửa và loại nước, là phương pháp sản xuất tinh bột thông thường, sau đó là bước làm khô, và do đó có thể thu được các hạt tinh bột đã được xử lý bằng enzym mong muốn.

Các đối tượng của sáng chế, ví dụ, là như sau:

Điểm 1: Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột, phương pháp này bao gồm các bước:

xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym;

trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp;



gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và

làm nguội hỗn hợp chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym đã gelatin hóa nhờ đó gel hóa tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột, trong đó:

enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza có đặc tính là có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột, và xyclodextrin glucanotransferaza.

Điểm 2: Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*, và xyclodextrin glucanotransferaza.

Điểm 3: Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*, và xyclodextrin glucanotransferaza.

Điểm 4: Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên AMG, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên OPTIDEX L-400, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của DANISCO dưới tên DIAZYME X4NP, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên glucoamylaza “Amano” SD, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus niveus* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Gluczyme AF6, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới

tên Sumizyme,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên transglucosidaza L “Amano”,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên Transglucosidaza L-500,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Biozyme A,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme L,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Danisco dưới tên AMYLEX A3,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme AS, isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata* bán trên thị trường của Sigma dưới tên isoamylaza, xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Bacillus licheniformis* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên Toruzyme, và xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*) bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Xyclodextrin glucanotransferaza “Amano”.

Điểm 5: Phương pháp theo điểm 1, trong đó:

(1) enzym được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11, và có hoạt tính thủy phân tinh bột; hoặc

(2) enzym được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 13, và có hoạt tính transglycosyl hóa; trong đó điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện lai hóa trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 X SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trisatrit 75 mM),

natri phosphat 50 mM (độ pH = 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và tiếp theo, rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua có nồng độ 150 mM và natri xitrat có nồng độ 15 mM).

Điểm 6: Phương pháp theo điểm 1, trong đó:

(1) enzyme có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 hoặc 12, và có hoạt tính thủy phân tinh bột; hoặc

(2) enzyme có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, và có hoạt tính transglycosyl hóa.

Điểm 7: Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của các tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột đã cải biến hóa học.

Điểm 8: Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, và các hạt tinh bột không được cải biến hóa học cũng không được xử lý vật lý ở giai đoạn bất kỳ cho đến khi thực phẩm chứa gel tinh bột được tạo ra bằng phương pháp này.

Điểm 9: Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột đã xử lý vật lý, phương pháp này còn bao gồm bước cải biến hóa học tinh bột đã xử lý bằng enzyme, và tinh bột đã xử lý bằng enzyme và đã cải biến hóa học này được trộn với nguyên liệu

thực phẩm và nước.

Điểm 10: Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý vật lý tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym và đã xử lý vật lý được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.

Điểm 11: Thực phẩm chứa gel tinh bột được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 1.

Điểm 12: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này là thực phẩm loại có hàm ẩm cao và lượng ẩm của thực phẩm này lớn hơn 40 g và nhỏ hơn 95 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

Điểm 13: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước sốt cay và nước sốt, và mì sợi.

Điểm 14: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm thấp và lượng ẩm của thực phẩm này nằm trong khoảng từ 1 g đến 40 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

Điểm 15: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh mì, bánh kẹo kiểu phương Tây, và thực phẩm chiên rán.

Điểm 16: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*, và cyclodextrin glucanotransferaza.

Điểm 17: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*, và xylodextrin glucanotransferaza.

Điểm 18: Thực phẩm theo điểm 11, trong đó tinh bột được thu từ cây sắn, ngô hoặc cây lúa mì.

Theo phương án cụ thể, các đối tượng của sáng chế, ví dụ, là như sau:

Điểm 1A: Thực phẩm chứa tinh bột đã nấu bằng nhiệt, chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

thực phẩm chứa tinh bột là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước trộn nguyên liệu thực phẩm và tinh bột đã xử lý bằng enzym và sau đó gia nhiệt chúng,

tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young cao hơn môđun Young của tinh bột chưa qua xử lý hoặc ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của tinh bột chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 2A: Thực phẩm theo điểm 1A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym, và tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo

gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 3A: Thực phẩm theo điểm 1A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym, và

tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột sắn chưa qua xử lý, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột sắn chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 4A: Thực phẩm theo điểm 1A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym, và

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột ngô chưa qua xử lý, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột ngô chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 5A: Thực phẩm chứa tinh bột đã nấu bằng nhiệt, chứa tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

thực phẩm chứa tinh bột này là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước trộn nguyên liệu thực phẩm và tinh bột lúa mì đã xử lý



bằng enzym và sau đó gia nhiệt chúng,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ  $5,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $8,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup>, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 150 g đến 450 g, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 6A: Thực phẩm chứa tinh bột đã nấu bằng nhiệt, chứa tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

thực phẩm chứa tinh bột này là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước trộn nguyên liệu thực phẩm và tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym và sau đó gia nhiệt chúng,

tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột sẵn chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ  $5,2 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $2,7 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> (nằm trong khoảng từ  $5,2 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $1,6 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> theo một phương án), hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 55 g đến 150 g, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 7A: Thực phẩm chứa tinh bột đã nấu bằng nhiệt chứa tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có độ nhớt cao và khả năng tạo gel,

thực phẩm chứa tinh bột này là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước trộn nguyên liệu thực phẩm và tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym và sau đó gia nhiệt chúng,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột ngô chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có mô đun Young nằm trong khoảng từ  $6,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $9,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup>, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 210 g đến 450 g (nằm trong khoảng từ 220 g đến 450 g theo một phương án), khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 8A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 7A, trong đó tinh bột tạo gel trong thực phẩm.

Điểm 9A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 8A, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm cao và lượng ẩm của thực phẩm này là lớn hơn 40 g và nhỏ hơn 95 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

Điểm 10A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 9A, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước xốt cay và nước xốt, và mì sợi.

Điểm 11A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 8A, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm thấp và lượng ẩm của thực phẩm này nằm trong khoảng từ 1 g đến 40 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

Điểm 12A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 8A và 11A, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh mì, bánh kẹo kiểu phương Tây, và thực phẩm chiên rán.

Điểm 13A: Thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1A đến 12A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

Điểm 14A: Thực phẩm theo điểm 13A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*.

Điểm 15A: Thực phẩm theo điểm 13A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*.

Điểm 16A: Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa tinh bột, phương pháp này bao gồm các bước:

bổ sung và trộn tinh bột đã xử lý bằng enzym vào nguyên liệu thực phẩm; và

nấu bằng nhiệt hỗn hợp này;

tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các

hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan;

tinh bột đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young cao hơn môđun Young của tinh bột chưa qua xử lý hoặc ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của tinh bột chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 17A: Tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này có thể tạo gel có môđun Young cao hơn môđun Young của tinh bột chưa qua xử lý hoặc ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của tinh bột chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 18A: Tinh bột theo điểm 17A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym, và

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý,

hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 19A: Tinh bột theo điểm 17A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym, và

tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột sắn chưa qua xử lý, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột sắn chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 20A: Tinh bột theo điểm 17A, trong đó tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym, và

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột ngô chưa qua xử lý, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột ngô chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 21A: Tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các

nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym này có thể tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ  $5,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $8,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup>, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 150 g đến 450 g, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 22A: Tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột sắn chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young nằm trong khoảng từ  $5,2 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $2,7 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> (nằm trong khoảng từ  $5,2 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $1,6 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> theo một phương án), hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 55 g đến 150 g, khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 23A: Tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột ngô chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym này có thể tạo gel có môđun Young



nằm trong khoảng từ  $6,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> đến  $9,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup>, hoặc ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 210 g đến 450 g (220 g hoặc lớn hơn và 450 g hoặc nhỏ hơn theo một phương án), khi được xác định bởi lưu biến kế.

Điểm 24A: Tinh bột theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18A đến 23A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

Điểm 25A: Tinh bột theo điểm 24A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*.

Điểm 26A: Tinh bột theo điểm 24A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*.

Điểm 27A: Phương pháp sản xuất tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao, phương pháp này bao gồm các bước:

xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C;

enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza có đặc tính là có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

Điểm 28A: Phương pháp theo điểm 27A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*.

Điểm 29A: Phương pháp theo điểm 27A hoặc 28A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*.

Điểm 30A: Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27A đến 29A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên AMG, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên OPTIDEX L-400, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của DANISCO dưới tên DIAZYME X4NP, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên glucoamylaza “Amano” SD, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus niveus* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Gluczyme AF6, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên transglucosidaza L “Amano”,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên Transglucosidaza L-500,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Biozyme A,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme L,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Danisco dưới tên AMYLEX A3,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme AS, và isoamylaza thu được từ *Pseudomonas*

*amyloclavata* bán trên thị trường của Sigma dưới tên isoamylaza.

Điểm 31A: Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27A đến 30A, trong đó enzym thủy phân tinh bột được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11, và có hoạt tính thủy phân tinh bột; trong đó điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện lai hóa trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 X SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trisatrat 75 mM), natri phosphat 50 mM (độ pH = 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và sau đó rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM và natri trisatrat 15 mM).

Điểm 32A: Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27A đến 30A, trong đó enzym thủy phân tinh bột có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 hoặc 12, và có hoạt tính thủy phân tinh bột.

Điểm 33A: Tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan;

tinh bột đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các nhóm

hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên AMG, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên OPTIDEX L-400, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của DANISCO dưới tên DIAZYME X4NP, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên glucoamylaza “Amano” SD, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus niveus* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Gluczyme AF6, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên transglucosidaza L “Amano”,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên Transglucosidaza L-500,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Biozyme A,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme L,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Danisco dưới tên AMYLEX A3,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme AS, và isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata* bán trên thị trường của Sigma dưới tên isoamylaza.

Điểm 34A: Tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý

các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan;

tinh bột đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

enzym thủy phân tinh bột được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11, và có hoạt tính thủy phân tinh bột; trong đó điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện lai hóa trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 X SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trisatrat 75 mM), natri phosphat 50 mM (độ pH 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và sau đó rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C sử dụng dung dịch SSC có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM và natri xitrat 15 mM).

Điểm 35A: Tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao,

tinh bột đã xử lý bằng enzym này là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện trong đó các hạt tinh bột không được hòa tan;

tinh bột đã xử lý bằng enzym này không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza,

enzym thủy phân tinh bột có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10

hoặc 12, và có hoạt tính thủy phân tinh bột.

#### Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, tinh bột có đặc điểm “có khả năng tạo gel mạnh và độ nhớt cao” mà chưa từng có ở tinh bột thông thường đã được phát triển một cách thành công bằng cách sử dụng enzym có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

Vì tinh bột thông thường có khả năng tạo gel mạnh không thể có độ trương nở và gelatin hóa thích hợp trong vùng nhiệt độ gia nhiệt thông thường, nên thường để lại dạng bột khi được bổ sung vào thực phẩm. Để làm trương nở và gelatin hóa tinh bột thông thường có khả năng tạo gel mạnh đến mức thích hợp, đòi hỏi phải gia nhiệt ở nhiệt độ cao hơn so với vùng nhiệt độ gia nhiệt thông thường của thực phẩm. Như đối với tinh bột được xử lý axit và tinh bột giàu phân đoạn amyloza, chúng có khả năng tạo gel tuyệt vời, tuy nhiên chúng không có tính nhớt hoặc gần như không có tính nhớt, và do đó ứng dụng của chúng bị hạn chế. Ngay cả đối với tinh bột đã xử lý axit như trên, khả năng tạo gel vẫn có thể được cải thiện so với tinh bột thu được bằng các giải pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật bằng cách xử lý enzym bằng phương pháp theo sáng chế, trong khi vẫn giữ nguyên độ nhớt ở mức độ nhất định.

Ngoài ra, mặc dù tinh bột được xử lý hóa học thường được sử dụng cho bánh bao từ tinh bột cây dương xỉ điều hâu (Warabimochi), nhưng vẫn cần thiết phải thực hiện kết hợp việc xử lý axetyl hóa và xử lý liên kết ngang phosphat.

Tinh bột được tạo thành ở đây là tinh bột mà trong đó các nhược điểm này đã được cải thiện. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý, hoặc tinh bột được tẩy trắng được sử dụng làm nguyên liệu thô, và



tinh bột được tạo thành ở đây được tạo ra trong điều kiện trong đó bước xử lý hóa học không được áp dụng ở giai đoạn bất kỳ của quy trình sản xuất, việc bổ sung vào thực phẩm thông thường, hoặc ứng dụng trong thực phẩm chứa tinh bột làm nguyên liệu thô chính không bị hạn chế, và tinh bột có thể được sử dụng trong tất cả các thực phẩm “được coi là thực phẩm”.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được tẩy trắng được sử dụng làm nguyên liệu thô và tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra trong điều kiện trong đó bước xử lý hóa học không được áp dụng ở giai đoạn bất kỳ của quy trình sản xuất, tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza không tương ứng với tinh bột đã qua xử lý thu được bằng cách cải biến hóa học trong chất phụ gia thực phẩm. Do vậy, có thể sản xuất ra thực phẩm mà không bổ sung chất phụ gia thực phẩm nếu tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza được sử dụng.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý được sử dụng làm nguyên liệu thô và tinh bột đã xử lý bằng enzym được tạo ra trong điều kiện trong đó không áp dụng bước xử lý hóa học cũng không áp dụng bước xử lý vật lý ở giai đoạn bất kỳ của quy trình sản xuất, vì tinh bột đã xử lý bằng enzym được sử dụng theo sáng chế có khả năng tạo gel cao hơn so với khả năng tạo gel của tinh bột chưa qua xử lý và không có liên kết ép buộc, tinh bột có thể được gelatin hóa ở mức thích hợp ngay cả ở nhiệt độ gia nhiệt thông thường và có thể có tính nhớt. Ngoài ra, hồ tinh bột thu được có khả năng kéo sợi thấp hơn bất kể chúng đã được gelatin hóa ở mức thích hợp. Gel thu được bằng cách sử dụng tinh bột theo sáng chế ở nồng độ cao có độ dẻo rất lớn. Tức là, trong trường hợp tinh

bột theo sáng chế được bổ sung vào thực phẩm có hàm ẩm cao, hình khối có thể được tạo ra và cả độ dẻo tự nhiên có thể được tạo ra nhờ khả năng tạo gel mạnh. Mặt khác, trong trường hợp tinh bột theo sáng chế được bổ sung vào thực phẩm có hàm ẩm thấp, kết cấu cùng với khả năng tan chảy tốt trong miệng có thể được tạo ra cho thực phẩm. Ngoài ra, dựa trên các đặc tính gelatin hóa của chúng, ngay cả trong bước vận hành cũng có ít hạn chế hơn.

Ngay cả trong trường hợp tinh bột đã qua chế biến hoặc tinh bột đã xử lý vật lý được sử dụng làm nguyên liệu thô hoặc thực phẩm được sản xuất ra trong điều kiện trong đó bước cải biến hóa học hoặc bước xử lý vật lý được áp dụng ở giai đoạn bất kỳ của quy trình sản xuất thực phẩm, thì thực phẩm theo sáng chế có gel cứng hơn và có kết cấu khác so với trường hợp mà trong đó thực phẩm được sản xuất bằng cách sử dụng tinh bột tương ứng được tạo ra mà không trải qua bước xử lý bằng enzym. Do vậy, theo sáng chế, có thể tạo ra thực phẩm có kết cấu khác với kết cấu của các thực phẩm thu được bằng các giải pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

#### **1. Nguyên liệu**

##### **1.1 Các hạt tinh bột**

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “các hạt tinh bột” được dùng để chỉ phân tử tinh bột ở trạng thái kết tinh. Các hạt tinh bột có thể là các hạt tinh bột chưa qua xử lý, hoặc có thể là các hạt tinh bột thu được bằng cách cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Trong trường hợp tinh bột đã xử lý bằng enzym được phân loại là thực phẩm được ưu tiên sử dụng, thì

các hạt tinh bột được sử dụng là các hạt tinh bột chưa qua xử lý thu được từ cây trồng. Cây trồng dự trữ các phân tử tinh bột dưới dạng các hạt (tức là, dưới dạng tinh thể lớn) trong lạp thể tạo bột. Các hạt này được gọi là các hạt tinh bột. Trong các hạt tinh bột, phân tử tinh bột được liên kết qua lại thông qua liên kết hydro hoặc các liên kết tương tự. Do vậy, các hạt tinh bột không dễ hòa tan trong nước như các phân tử tinh bột, và cũng không dễ tiêu hóa. Khi các hạt tinh bột được gia nhiệt cùng với nước, chúng trương nở và các phân tử được gỡ rối để tạo thành chất keo. Sự thay đổi này được gọi là “gelatin hóa”. Kích thước và hình dạng của các hạt tinh bột thay đổi phụ thuộc vào cây trồng từ đó các hạt tinh bột thu được. Ví dụ, kích thước hạt trung bình của các hạt tinh bột ngô (tinh bột ngô) nằm trong khoảng từ 12  $\mu\text{m}$  đến 15  $\mu\text{m}$  và nhỏ hơn một chút, và kích thước tương đối đồng đều, so với kích thước của các hạt tinh bột khác. Các hạt tinh bột của cây lúa mì và lúa mạch được phân loại thành hai loại theo kích thước: các hạt tinh bột kích thước lớn có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20  $\mu\text{m}$  đến 40  $\mu\text{m}$ , và các hạt tinh bột kích thước nhỏ có kích thước hạt khoảng vài  $\mu\text{m}$ . Cây lúa có cấu trúc hạt tinh bột hỗn hợp trong đó nhiều hạt tinh bột nhỏ có góc cạnh có đường kính khoảng vài  $\mu\text{m}$  được tích lũy trong lạp thể tạo bột. Kích thước hạt trung bình của các hạt tinh bột khoai tây là khoảng 40  $\mu\text{m}$  và lớn nhất trong số các hạt thường được sử dụng làm nguyên liệu tinh bột thô. Theo sáng chế, các hạt tinh bột khác nhau bán trên thị trường đều có thể được sử dụng. Các hạt tinh bột có thể được sản xuất bằng phương pháp, ví dụ, tinh chế các hạt tinh bột từ cây trồng và được sử dụng theo sáng chế.

Ở trạng thái các hạt tinh bột, enzym khó tác động đến các hạt tinh bột vì các phân tử tinh bột được liên kết chặt chẽ với nhau. Theo phương án cụ thể, để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym được xử lý làm thực phẩm, các hạt tinh

bột được sử dụng theo sáng chế được tách ra hoặc được tinh chế từ cây trồng, nhưng không xử lý bằng axit, xử lý cải biến hóa học và xử lý nhiệt. Trong bản mô tả này, thuật ngữ các hạt tinh bột “chưa qua xử lý” được dùng để chỉ các hạt tinh bột được tạo ra một cách tự nhiên và không trải qua xử lý khác với các xử lý cần để tách riêng các hạt tinh bột khỏi các thành phần khác (ví dụ, protein và lipid) cùng tồn tại ở trạng thái tự nhiên. Do đó, các bước tương ứng trong phương pháp sản xuất các hạt tinh bột, như bước loại bỏ tạp chất ra khỏi cây trồng hoặc các bước tương tự để tinh chế tinh bột không được bao gồm trong việc xử lý các hạt tinh bột trong bản mô tả này. Các hạt tinh bột bất kỳ đều có thể được gọi là hạt tinh bột, miễn là chúng là các hạt tinh bột thường bán trên thị trường.

Theo phương án cụ thể khác, các hạt tinh bột được sử dụng theo sáng chế có thể là các hạt tinh bột được xử lý bằng cách cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Ví dụ về các hạt tinh bột được cải biến hóa học bao gồm tinh bột kép adipat axetyl hóa, tinh bột oxy hóa axetyl hóa, tinh bột kép phosphat axetyl hóa, tinh bột natri octenyl suxinat, tinh bột axetat, tinh bột oxy hóa, tinh bột được tẩy trắng, tinh bột kép hydroxypropyl phosphat, tinh bột hydroxypropyl, tinh bột kép phosphat, tinh bột đơn phosphat, và tinh bột kép phosphat phosphat hóa. “Tinh bột kép adipat axetyl hóa” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng anhydrit axetic và anhydrit adipic. “Tinh bột oxy hóa axetyl hóa” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách xử lý tinh bột bằng natri hypoclorit và sau đó este hóa nó với anhydrit axetic. “Tinh bột kép phosphat axetyl hóa” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxyclorea và anhydrit axetic hoặc vinyl axetat. “Tinh bột natri octenyl suxinat”

được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng octenyl succinic anhydrit. “Tinh bột axetat” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng anhydrit axetic hoặc vinyl axetat. “Tinh bột oxy hóa” được dùng để chỉ các chất thu được bằng cách xử lý tinh bột bằng natri hypoclorit, trong đó hàm lượng của nhóm carboxyl là 1,1% hoặc thấp hơn khi các nhóm carboxyl (còn được gọi là nhóm carboxyl) trong mẫu tinh bột được phân tích bằng phương pháp kiểm tra độ tinh khiết được mô tả trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội. Miễn là, ngay cả khi lượng nhóm carboxyl nằm trong khoảng nêu trên, “tinh bột được tẩy trắng” không được bao gồm trong định nghĩa về “tinh bột oxy hóa”. “Tinh bột được tẩy trắng” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách xử lý tinh bột bằng natri hypoclorit, trong đó hàm lượng của nhóm carboxyl là 0,1% hoặc thấp hơn khi nhóm carboxyl trong mẫu tinh bột được phân tích theo phương pháp kiểm tra độ tinh khiết được mô tả trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội, và trong đó kết quả thử nghiệm của “Thử nghiệm xác nhận (3)” của tinh bột oxy hóa được mô tả trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội là âm tính và trong đó có thể giải thích một cách hợp lý rằng sự thay đổi các tính chất, như độ nhớt, của tinh bột không do quá trình oxy hóa gây ra. Các tinh bột mà trong đó, ngay khi hàm lượng của nhóm carboxyl là 0,1% hoặc thấp hơn, thì các tính chất như độ nhớt của tinh bột thay đổi so với các tính chất của tinh bột tự nhiên được phân loại là tinh bột oxy hóa, và không được gọi là thực phẩm ở Nhật Bản mà được gọi là chất phụ gia thực phẩm. “Tinh bột kép hydroxypropyl phosphat” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxyclorea và ete hóa nó bằng propylen oxit. “Tinh bột hydroxypropyl ” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách ete



hóa tinh bột bằng propylen oxit. “Tinh bột kép phosphat” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxyclorua. “Tinh bột đơn phosphat” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng axit orthophosphoric, muối kali hoặc muối natri của chúng, hoặc natri tripolyphosphat. “Tinh bột kép phosphat được phosphat hóa” được dùng để chỉ tinh bột thu được bằng cách este hóa tinh bột bằng axit orthophosphoric, muối kali hoặc muối natri của chúng, hoặc natri tripolyphosphat, và este hóa nó bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxyclorua.

Ví dụ về các loại hạt tinh bột đã xử lý vật lý bao gồm tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm và tinh bột được ức chế bằng nhiệt.

Các hạt tinh bột được sử dụng theo sáng chế có thể là tinh bột trên mặt đất hoặc tinh bột dưới mặt đất. Ví dụ về tinh bột dưới mặt đất bao gồm tinh bột sắn, tinh bột khoai tây, tinh bột khoai lang, và tinh bột sắn dây. Ví dụ về tinh bột trên mặt đất bao gồm tinh bột lúa mì, tinh bột ngô (ví dụ, tinh bột ngô có hàm lượng amyloza cao, tinh bột ngô thông thường, và tinh bột ngô dạng sáp), tinh bột gạo (ví dụ, tinh bột gạo nếp và tinh bột gạo không phải gạo nếp), tinh bột đậu (ví dụ, tinh bột đậu xanh, tinh bột đậu Hà Lan, tinh bột đậu đỏ, và tinh bột đậu tằm), và tinh bột hạt dền. Các hạt tinh bột được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là tinh bột thu được từ cây sắn, ngô hoặc cây lúa mì. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý được sử dụng làm các hạt tinh bột, tốt hơn nếu sử dụng tinh bột sắn chưa qua xử lý, tinh bột ngô chưa qua xử lý hoặc tinh bột lúa mì chưa qua xử lý. Trong trường hợp tinh bột được cải biến hóa học được sử dụng làm các hạt tinh bột, tốt hơn nếu sử dụng tinh bột kép adipat axetyl hóa, tinh bột oxy hóa axetyl hóa, tinh bột kép phosphat axetyl hóa, tinh bột natri



octenyl suxinat, tinh bột axetat, tinh bột oxy hóa, tinh bột được tẩy trắng, tinh bột kép hydroxypropyl phosphat, tinh bột hydroxypropyl, tinh bột kép phosphat, tinh bột đơn phosphat hoặc tinh bột kép phosphat phosphat hóa của tinh bột sắn, tinh bột ngô hoặc tinh bột lúa mì. Trong trường hợp tinh bột đã xử lý vật lý được sử dụng, tốt hơn nếu sử dụng tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm hoặc tinh bột được ức chế bằng nhiệt của tinh bột sắn, tinh bột ngô hoặc tinh bột lúa mì.

Vì cấu trúc của tinh bột thay đổi rất nhiều phụ thuộc vào nguồn gốc nên đặc điểm về tính chất vật lý thay đổi phụ thuộc vào nguồn gốc. Ví dụ, mặc dù tinh bột lúa mì chưa qua xử lý có khả năng tạo gel cao, nhưng hồ tinh bột của chúng có độ nhớt thấp và hồ tinh bột mờ đục. Mặc dù tinh bột sắn chưa qua xử lý có khả năng tạo gel thấp, nhưng hồ tinh bột của chúng có độ nhớt cao và hồ tinh bột có độ trong suốt cao và mức độ phân giải là mức trung bình. Cụ thể, mặc dù tinh bột sắn chưa qua xử lý không đắt, nhưng hồ tinh bột của chúng trong suốt, và do vậy có ưu điểm là được bổ sung một cách dễ dàng, nhưng ứng dụng của chúng bị hạn chế vì khả năng tạo gel thấp. Ngoài ra, tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý có thể không được sử dụng trong các ứng dụng mà trong đó cần độ nhớt cao do độ nhớt thấp của hồ tinh bột thấp. Mặc dù tinh bột ngô chưa qua xử lý có khả năng tạo gel cao, nhưng hồ tinh bột của chúng có độ nhớt khá thấp, và hồ tinh bột mờ đục và có tính chất phân giải cao.

Việc cải biến hóa học làm thay đổi tính chất vật lý của các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Thông thường, việc tạo liên kết ngang như liên kết ngang phosphat hoặc liên kết ngang adipat thường làm cho gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột thu được trở nên cứng hơn và có độ đục cao hơn so với gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột chưa qua xử lý.

Nói chung, việc xử lý hydroxypropyl hóa, axetyl hóa và oxy hóa thường cải thiện độ trong suốt và làm mềm hơn đối với gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột thu được so với gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Thông thường, việc xử lý bằng axit octenyl succinic có thể làm cho gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột thu được chứa dầu.

Việc xử lý vật lý cũng làm thay đổi tính chất vật lý của các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Ví dụ, thông thường, việc xử lý nhiệt-hơi ẩm làm cho gel được tạo thành bằng cách sử dụng hạt tinh bột thu được trở nên cứng hơn và độ nhớt của hồ tinh bột thấp hơn so với gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Ví dụ, thông thường, việc xử lý ức chế bằng nhiệt thường làm cho gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột thu được cứng hơn so với gel được tạo thành bằng cách sử dụng các hạt tinh bột chưa qua xử lý. Ngoài ra, khi thời gian xử lý nhiệt khô dài, tinh bột thu được thường thể hiện hồ tinh bột có độ nhớt thấp như tinh bột đã tạo liên kết ngang mức độ cao.

Tốt hơn nếu các hạt tinh bột được sử dụng theo sáng chế chứa tạp chất càng thấp càng tốt. Hàm lượng của tạp chất trong các hạt tinh bột tốt hơn nếu là khoảng 10% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và vẫn tốt hơn nữa nếu là khoảng 1% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

## 1.2 Enzym

Enzym có thể sử dụng trong sáng chế là enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza. Enzym thủy phân tinh bột được phân loại đại thể thành  $\alpha$ -

amylaza,  $\beta$ -amylaza, amyloglucosidaza, isoamylaza, pullulanaza và  $\alpha$ -glucosidaza. Tuy nhiên, ngay cả trong enzym được phân loại là cùng enzym (ví dụ,  $\alpha$ -amylaza), nếu vi sinh vật sản xuất enzym là khác nhau, thì các đặc điểm như tính đặc hiệu phản ứng và tính đặc hiệu cơ chất của enzym cũng sẽ khác nhau. Vì các enzym thủy phân tinh bột này và glycosyltransferaza này được phân bố rất rộng rãi ở động vật, vi sinh vật và thực vật, có thể nói rằng có vô hạn các loại enzym thủy phân tinh bột và glycosyltransferaza.

Enzym thủy phân tinh bột có thể sử dụng trong việc sản xuất tinh bột theo sáng chế là enzym thủy phân tinh bột được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza và  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột. Trong bản mô tả này, “ $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột” là  $\alpha$ -amylaza trong đó môđun Young hoặc ứng suất gãy của tinh bột sau khi xử lý bằng enzym cao hơn môđun Young hoặc ứng suất gãy của tinh bột trước khi xử lý bằng enzym là 10% hoặc cao hơn, khi được xác định bằng phương pháp đánh giá nêu dưới đây. Enzym thủy phân tinh bột được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là enzym được phân loại là  $\alpha$ -amylaza, amyloglucosidaza, isoamylaza hoặc  $\alpha$ -glucosidaza. Enzym được phân loại là  $\beta$ -amylaza hoặc pullulanaza sẽ không được ưu tiên. Enzym được phân loại là amyloglucosidaza, isoamylaza hoặc  $\alpha$ -glucosidaza được coi là có thể tạo ra tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao nếu các enzym này được cho tác động đến các hạt tinh bột. Tuy nhiên, trong trường hợp enzym được phân loại là  $\alpha$ -amylaza, không phải tất cả enzym đều có thể thích hợp được sử dụng và cần phải chọn  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột, và tinh bột theo sáng chế không thể được tạo ra ngay cả khi  $\alpha$ -amylaza không có

hoạt tính này được sử dụng.

Có thể đánh giá xem enzym được phân loại là  $\alpha$ -amylaza là  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột hay không, bằng phương pháp đánh giá sau.

Ví dụ về glycosyltransferaza có thể sử dụng trong việc sản xuất tinh bột theo sáng chế bao gồm xyclodextrin glucanotransferaza.

1.2.1 Phương pháp đánh giá  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột

$\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột có thể được đánh giá bằng phương pháp sau. 900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì, theo đó tạo ra huyền phù tinh bột lúa mì, và từng enzym được bổ sung vào đó. Lượng đường khử được giải phóng trong huyền phù bởi phản ứng được đo để xác định tỷ lệ phân giải. Khi tỷ lệ phân giải đạt đến 15%, các hạt tinh bột được thu hồi bằng cách lọc, được rửa bằng nước và sau đó được làm khô. Bằng cách sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được theo cách này, môđun Young và ứng suất gãy được xác định bằng phép phân tích bằng lưu biến kế. Trong trường hợp môđun Young hoặc ứng suất gãy của tinh bột sau khi xử lý bằng enzym tăng thêm 10% hoặc cao hơn so với môđun Young hoặc ứng suất gãy của tinh bột trước khi xử lý bằng enzym, thì enzym này được đánh giá là  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột. Theo một ví dụ, kết quả đánh giá của nhiều enzym thủy phân tinh bột khác nhau được thể hiện trong Bảng 1A dưới đây.

Bảng 1A

| Tên của nhóm enzym         | Nguồn gốc                         | Tên sản phẩm (Hãng bán sản phẩm)    | Ứng suất gây                                          |                           | Môđun Young                                           |                           | Đánh giá               |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|
|                            |                                   |                                     | Giá trị đo được (g)                                   | % tương đối <sup>*1</sup> | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> )                | % tương đối <sup>*2</sup> |                        |
| Trước khi xử lý bằng enzym | -                                 | -                                   | 141                                                   | 100                       | 4.601.665                                             | 100                       | Tham chiếu             |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)              | 197                                                   | 140                       | 5.518.329                                             | 120                       | Có thể sử dụng         |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Aspergillus niger</i>          | AMYLEX A3 (DANISCO)                 | 211                                                   | 150                       | 5.465.779                                             | 119                       | Có thể sử dụng         |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Bacillus subtilis</i>          | Novamyl (Novo)                      | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không thể sử dụng được |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | $\alpha$ -amylase (Reagent) (Sigma) | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không thể sử dụng được |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Bacillus</i> sp.               | Maltogenase L (Novo)                | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không thể sử dụng được |
| $\alpha$ -amylaza          | <i>Bacillus licheniformis</i>     | Termamyl 120L (Novo)                | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                           | Không thể sử dụng được |

\*1: Ứng suất gây tương đối = {(Ứng suất gây sau khi xử lý bằng enzym) / (Ứng suất gây trước khi xử lý bằng enzym)} x 100

\*2: Môđun Young tương đối = {(Môđun Young sau khi xử lý bằng enzym) / (Môđun Young trước khi xử lý bằng enzym)} x 100

Như nêu trên, có thể quyết định một cách dễ dàng xem các  $\alpha$ -amylaza khác nhau có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột hay không. Lưu ý rằng phương pháp phân tích bằng lưu biến kế chuyên dụng là như được nêu trong phần 1.2.2 dưới đây.

### 1.2.2 Phương pháp phân tích bằng lưu biến kế chuyên dụng

Hồ tinh bột được tạo ra sao cho hàm lượng tinh bột là 20% khối lượng tính theo chất khô, và sau đó được đổ vào hộp Krehalon có độ dày cuộn gấp là 45 mm. Hồ tinh bột sau khi đổ vào hộp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C ở tốc độ 1°C/phút và được giữ ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút. Sau đó, hồ tinh bột này được để nguội trong bể nước có nhiệt độ không đổi ở nhiệt độ 20°C trong 30 phút và sau đó được làm lạnh xuống 5°C trong tủ lạnh. Sau khi làm lạnh, nó được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 5°C trong 16 giờ, sau đó nó được để ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) trong 4 giờ để nhiệt độ của nó quay trở lại nhiệt độ trong phòng, và sau đó tiến hành đo bằng lưu biến kế (RT-2010J-CW) do Rheotech Inc sản xuất. Việc đo được thực hiện trong điều kiện đo của lưu biến kế: Mục thử nghiệm: thử nghiệm độ gãy; chiều cao của mẫu: 25 mm; và tốc độ chuyển động (tốc độ gãy) của mẫu: 6 cm/phút, sử dụng bộ thích ứng của gá hình cầu để đo độ nhớt  $\phi 5$  (đường kính: 5 mm, diện tích: 19,635 mm<sup>2</sup>). Trong phép đo này, độ cứng của gel tinh bột được đánh giá bằng ứng suất gãy (g) và môđun Young (dyn/cm<sup>2</sup>).

### 1.2.3: Ví dụ được ưu tiên sử dụng trong đơn

Để sản xuất tinh bột theo sáng chế, enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột, và xyclodextrin glucanotransferaza



được sử dụng.

Theo phương án cụ thể, enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ giống *Aspergillus*, và xyclodextrin glucanotransferaza.

Theo phương án cụ thể, enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*, và xyclodextrin glucanotransferaza.

Theo phương án được ưu tiên, enzym được chọn từ nhóm bao gồm amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên AMG, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên OPTIDEX L-400, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của DANISCO dưới tên DIAZYME X4NP, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên glucoamylaza “Amano” SD, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus niveus* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Gluczyme AF6, amyloglucosidaza thu được từ *Rhizopus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên transglucosidaza L “Amano”,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của Genencor dưới tên Transglucosidaza L-500,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Biozyme A,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme L,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*

bán trên thị trường của Danisco dưới tên AMYLEX A3,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger* bán trên thị trường của SHIN NIHON CHEMICALS Corporation dưới tên Sumizyme AS, isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata* bán trên thị trường của Sigma dưới tên isoamylaza, xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Bacillus licheniformis* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên Toruzyme, và xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*) bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Xyclodextrin glucanotransferaza “Amano”.

Theo phương án cụ thể được ưu tiên, enzym là enzym thủy phân tinh bột, và enzym thủy phân tinh bột này được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11 và có hoạt tính thủy phân tinh bột; trong đó điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện lai hóa trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 x SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trisatrat 75 mM), natri phosphat 50 mM (độ pH = 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20  $\mu$ g/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và sau đó rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM và natri trisatrat 15 mM).

Theo phương án được ưu tiên, enzym thủy phân tinh bột có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 hoặc 12, và có hoạt tính thủy phân tinh bột.

#### 1.2.4. $\alpha$ -amylaza

$\alpha$ -amylaza tồn tại trong nhiều vi sinh vật, động vật và thực vật. Ví dụ về vi sinh vật sản xuất  $\alpha$ -amylaza bao gồm các vi sinh vật thuộc giống *Aspergillus* (ví dụ, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus sclerotiorum* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* (ví dụ, *Bacillus subtilis*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Geobacillus* (ví dụ, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermodenitrificans* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Lactobacillus* (ví dụ, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus manihottivorans* và các chủng tương tự); ngoài ra còn kể đến *Pseudomonas sp.*, *Pyrococcus furiosus*, *Rhizopus microsporus*, *Thermotoga maritima*, *Vibrio sp.* và các chủng tương tự. Ngoài ra, đã xác nhận rằng  $\alpha$ -amylaza thu được từ động vật tồn tại trong tuyến tụy của người, nước bọt của người, nước tiểu của người, tuyến tụy của lợn, tuyến tụy của bò, đường ruột của cá chép và các bộ phận tương tự khác, và  $\alpha$ -amylaza thu được từ thực vật tồn tại trong lúa mạch, cây lúa, cây lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, cây đậu tương và đậu tằm. Sinh vật tạo ra  $\alpha$ -amylaza không bị giới hạn ở các sinh vật này.

$\alpha$ -amylaza có thể là loại bán trên thị trường hoặc có thể được chiết xuất từ các sinh vật này bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền dựa trên trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ của  $\alpha$ -amylaza của các sinh vật này, hoặc có thể được tổng hợp hóa học.  $\alpha$ -amylaza bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng với điều kiện nó có đặc tính phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,4-glucosid theo kiểu đầu cuối.

$\alpha$ -amylaza được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là  $\alpha$ -amylaza từ giống *Aspergillus*, và tốt nhất nếu là  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus niger*.

Trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -amylaza tiêu biểu thu được từ *Aspergillus oryzae* được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -amylaza tiêu biểu thu được từ *Aspergillus niger* được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4. Xét thấy là  $\alpha$ -amylaza của các loài có quan hệ gần gũi có độ tương đồng rất cao và có hoạt tính enzym tương tự nhau. Do vậy,  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* được coi là có trình tự axit amin có độ tương đồng rất cao với SEQ ID NO: 2 và có hoạt tính enzym tương tự. Vì đã biết rằng  $\alpha$ -amylaza bán trên thị trường thu được từ *Aspergillus oryzae* có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột, nên  $\alpha$ -amylaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và  $\alpha$ -amylaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có đặc tính là có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột. Tương tự, vì đã biết rằng  $\alpha$ -amylaza bán trên thị trường thu được từ *Aspergillus niger* có các đặc tính là có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột, nên  $\alpha$ -amylaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và  $\alpha$ -amylaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có đặc tính là có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

$\alpha$ -amylaza được sử dụng theo sáng chế không phải là amylaza thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens*. Nguyên nhân là vì amylaza thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens* không thể tạo ra tinh bột có độ nhớt và khả năng tạo gel cao.

Nhiều  $\alpha$ -amylaza được bán trên thị trường. Ví dụ về  $\alpha$ -amylaza bán trên

thị trường được mô tả dưới đây: Biozyme F10SD (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Amano Enzyme Inc.), Biozyme (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Amano Enzyme Inc.), Kokulase (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation), Sumizyme L (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; SHIN NIHON CHEMICALS Corporation), AMYLEX A3 (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Danisco Japan Ltd.), GRINDAMYL (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Danisco Japan Ltd.), VERON AX (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; HIGUCHI INC.), VERON GX (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; HIGUCHI INC.), VERON M4 (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; HIGUCHI INC.), VERON ELS (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; HIGUCHI INC.), Sumizyme AS (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; SHIN NIHON CHEMICALS Corporation), Bakezyme P500 (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Nihon Siber Hegner K.K.), và  $\alpha$ -amylaza (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*; Sigma-Aldrich Corporation).

Các  $\alpha$ -amylaza bán trên thị trường này được phân tích axit amin để xác định trình tự axit amin của chúng, và trình tự ADN được thiết kế dựa trên trình tự axit amin đó, và sau đó trình tự ADN được đưa vào E. coli hoặc các vi khuẩn tương tự, và do đó  $\alpha$ -amylaza có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của  $\alpha$ -amylaza bán trên thị trường có thể được tạo ra.

#### 1.2.5 Amyloglucosidaza

Amyloglucosidaza được dùng để chỉ enzym có khả năng tạo ra  $\beta$ -D-glucosa bằng cách thủy phân liên kết 1,4- $\alpha$  ở đầu tận cùng không khử của mạch hydrat cacbon của tinh bột hoặc chất tương tự. Amyloglucosidaza thủy phân mạch  $\alpha$ -1,4-glucosit từ đầu tận cùng không khử, và cả mạch  $\alpha$ -1,6-glucosit, mặc dù tốc độ phân cắt thấp. Tên khoa học của amyloglucosidaza là

glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidaza. Tên khác của amyloglucosidaza là exo-1,4- $\alpha$ -D-glucosidaza, 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolaza, glucoamylaza,  $\gamma$ -amylaza,  $\alpha$ -glucosidaza tiêu thể, hoặc maltaza có tính axit. Amyloglucosidaza được phân loại là EC 3.2.1.3.

Amyloglucosidaza tồn tại trong nhiều vi sinh vật, động vật và thực vật. Ví dụ về vi sinh vật sản xuất amyloglucosidaza bao gồm các vi sinh vật thuộc giống *Aspergillus* (ví dụ, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Candida* (ví dụ, *Candida antarctica*, *Candida tsukubaensis* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Rhizopus* (ví dụ, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus delmar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Saccharomyces* (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces fibuligera*); ngoài ra còn kể đến *Clostridium thermoamylolyticum*, *Cladosporium resinae*, *Lentinus edodes*, *Mucor rouxianus*, *Magnaporthe grisea*, *Monascus kaoliang*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium oxalicum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* và các chủng tương tự. Ngoài ra, đã xác nhận rằng amyloglucosidaza thu được từ động vật tồn tại trong màng nhầy của ruột non của người, chuột cống và chuột nhắt, và amyloglucosidaza thu được từ thực vật tồn tại trong cây củ cải đường và các cây tương tự. Sinh vật tạo ra amyloglucosidaza không bị giới hạn ở các sinh vật này.

Amyloglucosidaza có thể có sẵn trên thị trường hoặc có thể được chiết xuất từ các sinh vật này bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, hoặc có thể



được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền dựa trên trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ của amyloglucosidaza của các sinh vật này, hoặc có thể được tổng hợp hóa học. Amyloglucosidaza bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng với điều kiện nó có các tính chất phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,4-glucosit và liên kết  $\alpha$ -1,6-glucosit theo kiểu exo từ phía đầu tận cùng không khử trong đơn vị glucoza để sản xuất  $\beta$ -glucoza.

Amyloglucosidaza được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là amyloglucosidaza từ giống *Aspergillus* hoặc amyloglucosidaza từ giống *Rizopus*, và tốt nhất nếu là amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* hoặc amyloglucosidaza thu được từ *Rizopus niveus*.

Trình tự nucleotit mã hóa amyloglucosidaza tiêu biểu thu được từ *Aspergillus niger* được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 6. Xét thấy là amyloglucosidaza của các loài có quan hệ gần gũi có độ tương đồng rất cao và có hoạt tính enzym tương tự. Do vậy, amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* được coi là có trình tự axit amin có độ tương đồng rất cao với SEQ ID NO: 6 và có hoạt tính enzym tương tự. Vì đã biết rằng amyloglucosidaza bán trên thị trường thu được từ *Aspergillus niger* có hoạt tính thủy phân tinh bột, amyloglucosidaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 và amyloglucosidaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có hoạt tính thủy phân tinh bột.

Amyloglucosidaza được sử dụng theo sáng chế không phải là amyloglucosidaza thu được từ *Candida tsukubaensis*. Nguyên nhân là vì amyloglucosidaza thu được từ *Candida tsukubaensis* không thể tạo ra tinh bột có độ nhớt và khả năng tạo gel cao.

Nhiều amyloglucosidaza được bán trên thị trường. Ví dụ về amyloglucosidaza bán trên thị trường được mô tả dưới đây: GlucS G (Nguồn gốc: *Rhizopus niveus*; Amano Enzyme Inc.), Gluczyme AF6 (Nguồn gốc: *Rhizopus niveus*; Amano Enzyme Inc.), Gluczyme NL4.2 (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Amano Enzyme Inc.), Brewing glucoamylaza “Amano” SD (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Amano Enzyme Inc.), GODO-ANGH (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; GODO SHUSEI CO., LTD.), OPTIDEX L-400 (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Genencor Kyowa), OPTIDEX L (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Genencor Kyowa), Sumizyme (Nguồn gốc: *Rhizopus oryzae*; SHIN NIHON CHEMICALS Corporation), Sumizyme SG (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; SHIN NIHON CHEMICALS Corporation), Sumizyme HG (Nguồn gốc: *Rhizopus oryzae*; SHIN NIHON CHEMICALS Corporation), GLUCOZYME #20000 (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; Nagase Chemtex Corporation), AMG (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Novozymes Japan Ltd.), GLUTASE (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; HBI Enzyme Ltd.), UNIASE K,2K (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO.,LTD.), UNIASE 30 (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO.,LTD.), UNIASE 60F (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO.,LTD.), MAGNUX JW-201 (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; Rakuto Kasei Industrial Co., Ltd.), GRINDAMYL AG (Nguồn gốc: *Aspergillus sp.*; Danisco Japan Ltd.), DIAZYME X4NP (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Danisco Japan Ltd.), Bakezyme AG800 (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Nihon Siber Hegner K.K.), Amyloglucosidaza (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich Corporation), Amyloglucosidaza (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; Sigma-Aldrich Corporation), và

Glucoamylaza (Nguồn gốc: *Rhizopus sp.*; Toyobo Co., Ltd.).

Các amyloglucosidaza bán trên thị trường này được phân tích axit amin để xác định trình tự axit amin của chúng, và trình tự ADN được thiết kế dựa trên trình tự axit amin, và sau đó trình tự ADN được đưa vào *E. coli* hoặc chủng tương tự, và do đó amyloglucosidaza có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của amyloglucosidaza bán trên thị trường có thể được tạo ra.

#### 1.2.6 Isoamylaza

Isoamylaza được dùng để chỉ enzym phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,6-glucosit ở điểm phân nhánh của amylopectin, glycogen hoặc các chất tương tự để tạo ra polysacarit mạch thẳng giống amyloza. Tên khác của isoamylaza là glycogen 6-glucanohydrolaza. Isoamylaza được phân loại là EC3.2.1.68. Isoamylaza có thể thu được từ sinh vật bất kỳ có khả năng tạo ra isoamylaza.

Isoamylaza tồn tại trong nhiều vi sinh vật, động vật và thực vật. Ví dụ về vi sinh vật tạo ra isoamylaza bao gồm *Flavobacterium sp.*; *Bacillus sp.*; ngoài ra, còn kể đến *Pseudomonas amyloclavata*, *Sulfolobus solfataricus* và các chủng tương tự. Ngoài ra, đã xác nhận rằng isoamylaza thu được từ động vật tồn tại trong tuyến tụy của người và cơ quan tương tự, và isoamylaza thu được từ cây trồng tồn tại trong *Oryza sativa*, củ khoai tây (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis thaliana* và cây tương tự. Sinh vật tạo ra isoamylaza không bị giới hạn ở các sinh vật này.

Isoamylaza có thể là loại bán trên thị trường hoặc có thể được chiết xuất từ các sinh vật này bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền dựa trên trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ của isoamylaza của các sinh vật này, hoặc có thể được tổng hợp

hóa học. Isoamylaza bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng với điều kiện nó có đặc tính phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,6-glucosit của amylopectin theo kiểu đầu cuối.

Isoamylaza được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là isoamylaza từ giống *Flavobacterium* hoặc giống *Pseudomonas*, và tốt hơn nữa nếu isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.* hoặc isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*.

Trình tự nucleotit mã hóa isoamylaza tiêu biểu thu được từ *Flavobacterium sp.* được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8. Trình tự nucleotit mã hóa isoamylaza tiêu biểu thu được từ *Pseudomonas amyloclavata* được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Xét thấy rằng isoamylaza của các loài có quan hệ gần gũi có độ tương đồng rất cao và có hoạt tính enzym tương tự nhau. Do vậy, isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.* có trình tự axit amin có độ tương đồng rất cao với SEQ ID NO: 8 được coi là có hoạt tính enzym tương tự. Vì đã biết rằng isoamylaza bán trên thị trường thu được từ *Flavobacterium sp.* có hoạt tính thủy phân tinh bột, nên isoamylaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8 và isoamylaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có hoạt tính thủy phân tinh bột. Tương tự, vì đã biết rằng isoamylaza bán trên thị trường thu được từ *Pseudomonas amyloclavata* có hoạt tính thủy phân tinh bột, isoamylaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 và isoamylaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có hoạt tính thủy phân tinh bột.

Nhiều isoamylaza được bán trên thị trường. Ví dụ về isoamylaza bán

trên thị trường được mô tả dưới đây: GODO-FIA (Nguồn gốc: *Flavobacterium odoratum*; GODO SHUSEI CO., LTD.), và Isoamylaza (Nguồn gốc: *Pseudomonas sp.*; Sigma-Aldrich Corporation).

Các isoamylaza bán trên thị trường nêu trên được phân tích axit amin để xác định trình tự axit amin của chúng, và trình tự ADN được thiết kế dựa trên trình tự axit amin này, và sau đó trình tự ADN được đưa vào *E. coli* hoặc chủng tương tự, và do đó isoamylaza có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của isoamylaza bán trên thị trường có thể được tạo ra.

#### 1.2.7 $\alpha$ -glucosidaza

$\alpha$ -glucosidaza được dùng để chỉ enzym thủy phân liên kết  $\alpha$ -1,4-glucosit ở đầu tận cùng không khử để tạo ra  $\alpha$ -glucoza. Tên khoa học của  $\alpha$ -glucosidaza là  $\alpha$ -D-glucosit glucohydrolaza. Tên khác của  $\alpha$ -glucosidaza là maltaza, glucoinvertaza hoặc glucosit sucraza.  $\alpha$ -D-glucosidaza được phân loại là EC 3.2.1.20.

$\alpha$ -glucosidaza tồn tại trong nhiều vi sinh vật, động vật và thực vật. Ví dụ về vi sinh vật sản xuất  $\alpha$ -glucosidaza bao gồm các vi sinh vật thuộc giống *Aspergillus* (ví dụ, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* (ví dụ, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoglucosidius*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*; các vi sinh vật thuộc giống *Lactobacillus* (*Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus brevis* và các chủng tương tự); các vi sinh vật thuộc giống *Penicillium* (*Penicillium brevicompactum*, *Penicillium*

*citrinum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium purpurogenum*); các vi sinh vật thuộc giống *Pyrococcus* (*Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* và các chủng tương tự), các vi sinh vật thuộc giống *Saccharomyces* (*Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fibuligera*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces logos* và các chủng tương tự); Ngoài ra, *Candida tropicalis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermotoga maritima*, *Escherichia coli* và các chủng tương tự. Đã xác nhận rằng  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ động vật tồn tại ở rất nhiều động vật từ các loài động vật không xương sống như động vật thân mềm, loài giáp xác và côn trùng đến các loài động vật có xương sống như cá, động vật lưỡng cư, loài bò sát, chim, và động vật có vú, và  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ thực vật tồn tại trong cây đậu, cây lúa, kiều mạch, ngũ cốc, hạt củ cải đường và các cây tương tự. Lưu ý rằng sinh vật có khả năng sản xuất  $\alpha$ -glucosidaza không bị giới hạn ở các sinh vật nêu trên.

$\alpha$ -glucosidaza có thể là loại bán trên thị trường hoặc có thể được điều chế từ các sinh vật này bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền dựa trên trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ của  $\alpha$ -glucosidaza của các sinh vật này, hoặc có thể được tổng hợp hóa học.  $\alpha$ -glucosidaza bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng với điều kiện nó có các tính chất phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,4-glucosit và liên kết  $\alpha$ -1,6-glucosit theo kiểu exo từ phía đầu tận cùng không khử trong đơn vị glucoza để tạo ra  $\alpha$ -glucoza.

$\alpha$ -glucosidaza được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu là  $\alpha$ -glucosidaza từ giống *Aspergillus*, và tốt hơn nữa nếu là  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*.



Trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -glucosidaza tiêu biểu thu được từ *Aspergillus niger* được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 12. Xét thấy rằng  $\alpha$ -glucosidaza của các loài có quan hệ gần gũi có độ tương đồng rất cao và có hoạt tính enzym tương tự nhau. Do vậy,  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger* có trình tự axit amin có độ tương đồng rất cao với SEQ ID NO: 12 được coi là có hoạt tính enzym tương tự. Vì đã thấy rằng  $\alpha$ -glucosidaza bán trên thị trường thu được từ *Aspergillus niger* có hoạt tính thủy phân tinh bột, nên  $\alpha$ -glucosidaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 và  $\alpha$ -glucosidaza có trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự này cũng được coi là có hoạt tính thủy phân tinh bột.

Nhiều  $\alpha$ -glucosidaza được bán trên thị trường. Ví dụ về  $\alpha$ -glucosidaza bán trên thị trường được mô tả dưới đây: Transglucosidaza L 500 (Nguồn gốc: *Aspergillus*; Genencor Kyowa), Transglucosidaza L “Amano” (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Amano Enzyme Inc.),  $\alpha$ -Glucosidaza (Nguồn gốc: *Bacillus stearothermophilus*; Sigma-Aldrich Corporation),  $\alpha$ -Glucosidaza (Nguồn gốc: cây lúa; Sigma-Aldrich Corporation),  $\alpha$ -Glucosidaza (Nguồn gốc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sigma-Aldrich Corporation),  $\alpha$ -Glucosidaza (Nguồn gốc: *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich Corporation), và  $\alpha$ -Glucosidaza (Nguồn gốc: Vi sinh vật; Toyobo Co., Ltd.).

Các  $\alpha$ -glucosidaza bán trên thị trường nêu trên được phân tích axit amin để xác định trình tự axit amin của chúng, và trình tự ADN được thiết kế dựa trên trình tự axit amin, và sau đó trình tự ADN được đưa vào *E. coli* hoặc chủng tương tự, và do đó  $\alpha$ -glucosidaza có cùng trình tự axit amin như trình tự axit amin của  $\alpha$ -glucosidaza bán trên thị trường có thể được tạo ra.

### 1.2.8 Xyclodextrin glucanotransferaza

Xyclodextrin glucanotransferaza còn được gọi là CGTaza và được phân loại là EC2.4.1.19. CGTaza là enzym có khả năng xúc tác phản ứng transglycosyl hóa (tức là, phản ứng dị ly) của maltooligosacarit. CGTaza là enzym thực hiện phản ứng chuyển hóa để nhận mạch có từ 6 đến 8 glucoza ở đầu tận cùng không khử của phân tử cho, nhờ đó tạo vòng phần này để tạo ra xyclodextrin có mức độ polyme hóa từ 6 đến 8 và dextrin giới hạn không phải dạng vòng. Một ví dụ về CGTaza có thể sử dụng theo sáng chế là CGTaza thu được từ vi sinh vật đã biết hoặc CGTaza bán trên thị trường. CGTaza tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Bacillus licheniformis* bán trên thị trường của Novozyme dưới tên Toruzyme, và xyclodextrin glucanotransferaza (độ pH tối ưu 6,0) thu được từ *Paenibacillus macerans* (còn được phân loại là *Bacillus macerans*) bán trên thị trường của Amano Enzyme dưới tên Xyclodextrin glucanotransferaza “Amano”.

CGTaza có thể là loại bán trên thị trường hoặc có thể được chiết xuất từ sinh vật sản xuất CGTaza bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền dựa trên trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ của CGTaza của sinh vật sản xuất CGTaza, hoặc có thể được tổng hợp hóa học. CGTaza bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng với điều kiện nó có hoạt tính transglycosyl hóa, và hoạt tính có khả năng cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột.

### 1.2.9 Sử dụng enzym kết hợp

Trong trường hợp sản xuất tinh bột theo sáng chế, nhiều loại enzym thủy

phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza có thể được phép sử dụng kết hợp. Cụ thể là, vì một mình  $\alpha$ -glucosidaza không dễ phản ứng với các hạt tinh bột, nên tốt hơn nếu sử dụng nó ở dạng hỗn hợp với  $\alpha$ -amylaza.

#### 1.2.10 Giải thích chung về enzym

Trong bản mô tả này, enzym “có nguồn gốc” từ các sinh vật nhất định không chỉ có nghĩa là enzym được tách chiết trực tiếp từ sinh vật này, mà còn là enzym có cùng trình tự axit amin được tạo ra từ sinh vật khác dựa trên trình tự axit amin của enzym có trong sinh vật này, hoặc trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin này. Ví dụ, trong trường hợp đưa gen mã hóa enzym thu được từ các sinh vật vào *E. coli* và phân tách enzym này từ *E. coli*, thì enzym này cũng được gọi là “có nguồn gốc” từ sinh vật.

Trong bản mô tả này, lượng enzym lớn và dư được bổ sung các hạt tinh bột. Do vậy, lượng enzym này được biểu thị bằng % khối lượng. Không cần thiết phải biểu thị nó bằng đơn vị (U).

Nhiều  $\alpha$ -amylaza, amyloglucosidaza, isoamylaza,  $\alpha$ -glucosidaza và xyclodextrin glucanotransferaza là đã biết, và, do vậy, nhiều trình tự bazơ tự nhiên và trình tự axit amin của các enzym này là đã biết. Đã biết rằng có thể xảy ra trong tự nhiên các biến thể (được gọi là các biến thể alen) có trình tự khác nhau chút ít so với trình tự tự nhiên. Các biến thể có trong tự nhiên này và các biến thể được tạo ra bằng cách gây đột biến nhân tạo đối với các enzym tự nhiên, ngoài enzym được nêu làm ví dụ nêu trên, có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, chỉ cần là chúng có hoạt tính mong muốn. Các biến thể enzym này tốt hơn nếu có hoạt tính bằng, hoặc cao hơn, hoạt tính của enzym trước khi cải biến. Ví dụ, trình tự axit amin của enzym thủy phân tinh

bột được sử dụng theo sáng chế, theo phương án nhất định, có thể giống với (tức là, đồng nhất 100%) trình tự axit amin (tức là, trình tự axit amin tham chiếu) của enzym thủy phân tinh bột được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 12; hoặc trình tự axit amin này có thể, theo phương án khác, được thay đổi các axit amin với số lượng nhất định so với trình tự axit amin tham chiếu. Các thay đổi này có thể được chọn từ nhóm bao gồm làm khuyết, thay thế (bao gồm thay thế bảo toàn và không bảo toàn), hoặc cài ít nhất 1 axit amin (tốt hơn nếu là 1 hoặc nhiều; không có giới hạn trên cụ thể, ví dụ, khoảng 50 hoặc ít hơn, khoảng 40 hoặc ít hơn, khoảng 30 hoặc ít hơn, khoảng 20 hoặc ít hơn, khoảng 10 hoặc ít hơn, hoặc số lượng tương tự). Sự thay đổi này có thể xảy ra ở vị trí của đầu tận cùng amin hoặc đầu tận cùng carboxyl của trình tự axit amin tham chiếu, hoặc có thể xảy ra ở vị trí bất kỳ không phải là các đầu tận cùng này. Sự thay đổi gốc axit amin có thể được đặt rải rác với một gốc, hoặc một số gốc có thể kề nhau. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn một cách dễ dàng enzym mục tiêu có tính chất mong muốn. Theo cách khác, gen mã hóa enzym mục tiêu có thể được tổng hợp hóa học trực tiếp. Các phương pháp để thực hiện việc tổng hợp hóa học nêu trên là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc cải biến đối với enzym có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách gây đột biến định hướng điểm, gây đột biến bằng chất gây đột biến (xử lý gen của đối tượng bằng chất gây đột biến như nitrit, hoặc xử lý bằng tia UV), hoặc PCR tạo lỗi. Tốt hơn nếu sử dụng cách gây đột biến định hướng điểm, do có thể thu

được đột biến mục tiêu một cách dễ dàng, vì việc cải biến mục tiêu có thể được đưa vào ở vị trí mục tiêu khi sử dụng phương pháp gây đột biến bằng đột biến định hướng điểm. Theo cách khác, phân tử axit nucleic có trình tự mục tiêu có thể được tổng hợp trực tiếp. Các phương pháp tổng hợp hóa học này là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật gây đột biến định hướng điểm được mô tả trong, ví dụ, tài liệu: Nucl. Acid Research, Vol. 10, pp. 6487-6500 (1982).

Khi thiết kế các cải biến nêu trên, chỉ số kỵ nước của axit amin có thể được xem xét. Tầm quan trọng của chỉ số kỵ nước của axit amin trong việc tạo ra chức năng tương tác sinh học cho protein nhìn chung đã được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này (Kyte. J and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982). Bản chất kỵ nước của axit amin góp phần tạo ra cấu trúc bậc hai của protein thu được và, tiếp theo là, xác định sự tương tác giữa protein và phân tử khác (ví dụ, enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza, cơ chất, thụ thể, ADN, kháng thể, kháng nguyên và các phân tử tương tự). Axit amin được gán chỉ số kỵ nước dựa trên tính kỵ nước và bản chất tích điện của chúng. Chúng là: isoleuxin (+4,5); valin (+4,2); leuxin (+3,8); phenylalanin (+2,8); xystein/xystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glyxin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); tryptophan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); axit glutamic (-3,5); glutamin (-3,5); axit aspartic (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9); và arginin (-4,5).

Việc thay thế một axit amin nhất định bằng một axit amin khác có chỉ số kỵ nước tương tự là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, theo đó, có thể tạo ra protein vẫn có các chức năng sinh học gần như tương tự (ví dụ, protein gần như tương đương về hoạt tính enzym). Khi thay thế axit amin như trên, chỉ

số kỵ nước tốt hơn nếu nằm trong phạm vi  $\pm 2$ , tốt hơn nữa nếu nằm trong phạm vi  $\pm 1$ , tốt hơn nữa nếu nằm trong phạm vi  $\pm 0,5$ . Cần hiểu rằng trong lĩnh vực kỹ thuật này, việc thay thế axit amin dựa trên tính kỵ nước như trên sẽ cho hiệu quả. Như được nêu trong patent Mỹ số 4554101, các chỉ số ưa nước sau được gán cho các gốc axit amin: arginin (+3,0); lysin (+3,0); axit aspartic (+3,0 $\pm$ 1); axit glutamic (+3,0  $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glyxin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); xystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); leuxin (-1,8); isoleuxin (-1,8); tyrosin (-2,3); phenylalanin (-2,5); và tryptophan (-3,4). Cần phải hiểu rằng một axit amin có thể được thế bằng một axit amin khác có chỉ số ưa nước tương tự, và có thể vẫn tương đương về mặt sinh học. Khi thay thế axit amin như trên, chỉ số ưa nước tốt hơn nếu nằm trong phạm vi  $\pm 2$ , tốt hơn nữa nếu nằm trong phạm vi  $\pm 1$ , và tốt hơn nếu nằm trong phạm vi  $\pm 0,5$ .

Theo sáng chế, "thay thế bảo toàn" dùng để chỉ việc thay thế mà trong đó chỉ số ưa nước hoặc/và chỉ số kỵ nước tương tự, như nêu trên, giữa axit ban đầu và axit amin được thay thế, khi thay thế axit amin. Ví dụ về việc thay thế bảo toàn là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc thay thế trong số mỗi nhóm sau, ví dụ: arginin và lysin; axit glutamic và axit aspartic; serin và threonin; glutamin và asparagin; và valin, leuxin, và isoleuxin.

Enzym được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể được phân tách từ vi sinh vật có trong tự nhiên sản xuất enzym quan tâm nêu trên. Ví dụ, đầu tiên, vi sinh vật sản xuất enzym quan tâm được cấy vào môi trường thích hợp (ví dụ, canh L (1% Bacto-Trypton (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), 0,5% dịch chiết nấm men Bacto (Difco), 0,5% NaCl, độ pH =



7,3) và được nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp (ví dụ, nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C) qua đêm kèm theo lắc. Sau đó, môi trường nuôi cấy này được ly tâm để kết tủa tế bào vi khuẩn và sau đó thu phần dịch nổi nuôi cấy. Phần dịch nổi nuôi cấy thu được được cô bằng màng UF để thu được chất lỏng chứa enzym quan tâm. Khi cần tinh chế tiếp, thì dung dịch chứa enzym quan tâm đã tinh chế nêu trên có thể thu được bằng cách kết hợp cắt phân đoạn với sắc ký trao đổi ion trên Q-Sepharose hoặc cách tương tự, cắt phân đoạn với sắc ký lọc gel trên Sephacryl S-200HR (do Pharmacia sản xuất: hoặc cách tương tự và cắt phân đoạn với sắc ký kỵ nước trên Phenyl-TOYOPEARL 650M (do Tosoh Corporation sản xuất) hoặc cách tương tự, nếu cần.

Theo cách khác, enzym được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể thu được bằng cách đưa phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ mã hóa enzym quan tâm vào tế bào chủ thích hợp, để biểu hiện enzym này, và tinh chế enzym đã được biểu hiện từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy lỏng của nó.

Enzym đã tinh chế thu được được xử lý bằng trypsin, đoạn được xử lý bằng trypsin thu được được phân tách bằng HPLC, và trình tự axit amin của đầu tận cùng N của bất kỳ trong số các đoạn peptit đã được phân tách được xác định bằng cách sử dụng máy giải trình tự peptit. Sau đó, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit tổng hợp được điều chế dựa trên trình tự axit amin đã được xác định, thư viện hệ gen thích hợp hoặc thư viện cADN được sàng lọc, nhờ đó, có thể thu được phân tử axit nucleic (còn được gọi là gen) chứa trình tự bazơ mã hóa enzym tự nhiên. Phương pháp cơ bản để điều chế mẫu dò oligonucleotit và các thư viện ADN, và sàng lọc chúng bằng kỹ thuật lai các axit nucleic, là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*

(1989); DNA Cloning, Tập I và II (được biên tập bởi D. N. Glover, 1985); Oligonucleotide Synthesis (được biên tập bởi M. J. Gait, 1984); và Nucleic Acid Hybridization (được biên tập bởi B. D. Hames & S. J. Higgins, 1984).

Theo cách khác, dựa trên sự tương đồng với trình tự bazơ của gen mã hóa enzym nhất định mà trình tự bazơ mã hóa enzym của nó là đã biết, sự sàng lọc có thể được tiến hành bằng cách lai sử dụng mẫu dò axit nucleic chứa ít nhất một phần của trình tự bazơ này, nhờ đó, có thể thu được phân tử axit nucleic chứa loại khác của gen mã hóa enzym này. Các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo cách khác, các đoạn môi suy biến tương ứng với vùng mã được bảo toàn trong trình tự axit amin của các enzym khác nhau được tổng hợp, và PCR được thực hiện, và trình tự bazơ của enzym có thể thu được. Các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi thư viện hệ gen được sàng lọc, phân tử axit nucleic thu được có thể được tách dòng phụ sử dụng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, bằng cách trộn thể thực khuẩn  $\lambda$  chứa gen mục tiêu, *Escherichia coli* thích hợp và thể thực khuẩn trợ giúp thích hợp, plasmit chứa gen mục tiêu có thể thu được một cách dễ dàng. Sau đó, bằng cách biến nạp *Escherichia coli* thích hợp bằng cách sử dụng dung dịch chứa plasmit này, gen mục tiêu có thể được tách dòng phụ. Bằng cách nuôi cấy thể biến nạp thu được, có thể thu được ADN plasmit, ví dụ, bằng phương pháp SDS kiềm, và trình tự bazơ của gen mục tiêu có thể được xác định. Phương pháp xác định trình tự bazơ là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, bằng cách sử dụng các đoạn môi được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của đoạn ADN, và bằng cách sử dụng phản ứng

chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) sử dụng, ví dụ, ADN hệ gen của *Aquifex aeolicus*, *Rhodothermus obamensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus caldolyticus* hoặc chủng tương tự làm khuôn, gen mã hóa enzym có thể được khuếch đại trực tiếp.

Theo cách khác, gen mã hóa enzym có thể được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự bazơ đã biết.

Trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin của enzym được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể được thay đổi đến số lượng nhất định của nucleotit so với trình tự nucleotit (tức là, trình tự nucleotit tham chiếu) mã hóa trình tự axit amin tham chiếu được nêu trên đây. Các thay đổi này có thể được chọn từ nhóm bao gồm làm khuyết ít nhất một nucleotit, thay thế bằng ít nhất một nucleotit, bao gồm đồng hoán và dị hoán, hoặc cài xen ít nhất một nucleotit. Sự thay đổi này có thể xảy ra ở vị trí đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit tham chiếu, hoặc có thể xảy ra ở vị trí bất kỳ không phải là các đầu tận cùng này. Sự thay đổi của bazơ có thể được đặt rải rác với một bazơ, hoặc một số bazơ có thể kề nhau.

Sự thay đổi nucleotit có thể tạo ra đột biến vô nghĩa, sai nghĩa hoặc xê dịch khung trong trình tự ghi mã, và do đó sự thay đổi của enzym được mã hóa bởi trình tự bazơ đã được thay đổi này có thể được xảy ra.

Trong trường hợp enzym được sử dụng theo sáng chế là enzym thủy phân tinh bột, tốt hơn nếu enzym này có độ tương đồng ít nhất khoảng 20%, tốt hơn nếu ít nhất khoảng 30%, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 40%, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 50%, và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất khoảng 60%,

khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98% hoặc khoảng 99% với trình tự axit amin của enzym thủy phân tinh bột được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 hoặc 12, và có hoạt tính thủy phân tinh bột (các đặc tính có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột trong trường hợp cụ thể).

Trong trường hợp enzym được sử dụng theo sáng chế là glycosyltransferaza, tốt hơn nếu enzym này có độ tương đồng ít nhất khoảng 20%, tốt hơn nếu ít nhất khoảng 30%, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 40%, vẫn tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 50%, và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98% hoặc khoảng 99% với trình tự axit amin của glycosyltransferaza được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, và có hoạt tính transglycosyl hóa (các đặc tính có thể cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột trong trường hợp cụ thể).

Trong bản mô tả này, độ tương đồng của các trình tự được tính toán bằng cách sử dụng chương trình bắt cặp tối đa của GENETYX-WIN Ver.4.0 (Genetics Co., Ltd.). Chương trình này sắp hàng số liệu trình tự cần được phân tích, và số liệu trình tự cần được so sánh sao cho các cặp axit amin được bắt cặp giữa các trình tự là lớn nhất trong khi sự thay thế và làm khuyết được xem xét, và sau đó, đưa ra điểm số đối với mỗi trong số các trường hợp Bắt cặp đúng (Matches), Bắt cặp sai (Mismatches), và Khoảng trống (Gaps), tính toán tổng, cung cấp sự sắp hàng ở tổng nhỏ nhất, và tính toán độ tương đồng sau đó (Tài liệu tham khảo: Takashi, K., and Gotoh, O. 1984. Sequence Relationships among Various 4.5 S RNA Species J. Biochem. 92:1173-1177). Trong bản mô

tả này, tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự được tính toán bằng cách sử dụng chương trình bắt cặp tối đa của GENETYX-WIN Ver. 4.0 trong điều kiện Bắt cặp đúng (Matches)=-1; Bắt cặp sai (Mismatches)=1; Khoảng trống (Gaps)=1; \*N+=2.

Để làm enzym hoặc phân tử axit nucleic tự nhiên, thì enzym hoặc phân tử axit nucleic có trình tự không đồng nhất với, nhưng tương đồng với, trình tự axit amin của enzym hoặc trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin của enzym này cũng có thể được sử dụng. Enzym hoặc phân tử axit nucleic có độ tương đồng với enzym hoặc phân tử axit nucleic tự nhiên như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trong trường hợp axit nucleic, phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ có độ tương đồng ít nhất khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc khoảng 99% với trình tự đối tượng so sánh, và, trong trường hợp enzym, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, enzym có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc khoảng 99% với trình tự đối tượng so sánh, khi được so sánh trong chương trình bắt cặp tối đa trong, ví dụ, GENETYX-WIN Ver. 4.0 trong điều kiện được nêu trên đây.

Enzym thủy phân tinh bột, được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung của trình tự bazơ (ví dụ, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11) mã hóa enzym thủy phân tinh bột tự nhiên đã biết, có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế với điều kiện nó có hoạt tính thủy phân tinh bột (các đặc tính cải



thiện khả năng tạo gel của tinh bột trong trường hợp cụ thể). Enzym thủy phân tinh bột, mà được mã hóa bởi phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ được thay đổi thu được bằng cách thay đổi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung của trình tự bazơ mã hóa enzym thủy phân tinh bột tự nhiên đã biết cũng có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế với điều kiện nó có khả năng tạo ra tinh bột có độ nhớt cao có khả năng tạo gel. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn một cách dễ dàng gen mã hóa enzym thủy phân tinh bột mong muốn.

Transglycosylaza, được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung của trình tự bazơ (ví dụ, SEQ ID NO: 13) mã hóa transglycosylaza tự nhiên đã biết, có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế với điều kiện nó có hoạt tính transglycosylaza (các đặc tính cải thiện khả năng tạo gel của tinh bột trong trường hợp cụ thể). Transglycosylaza, được mã hóa bởi phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ thay đổi thu được bằng cách thay đổi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic có trình tự bổ sung của trình tự bazơ mã hóa transglycosylaza tự nhiên đã biết cũng có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế với điều kiện nó có khả năng tạo ra tinh bột có độ nhớt cao có khả năng tạo gel. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn một cách dễ dàng gen mã hóa transglycosylaza mong muốn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt" được dùng để chỉ điều kiện trong đó một trình tự lai với trình tự đặc hiệu, nhưng không lai với trình tự không đặc hiệu. Việc lựa chọn điều kiện nghiêm



ngặt thích hợp là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và được nêu, ví dụ, trong Molecular Cloning (Sambrook, et al., trên đây). Ví dụ, "điều kiện nghiêm ngặt" là sự lai hóa trong dung dịch chứa 50% formamit, 5 X SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trinati xitrat 75 mM), natri phosphat 50 mM (độ pH = 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và sau đó rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC (nước muối-natri xitrat) có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM và natri xitrat 15 mM). Do vậy, ví dụ, polynucleotit có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt, cụ thể, có nghĩa là, polynucleotit mà có thể được xác định bằng cách sử dụng điều kiện trong đó sự lai hóa được tiến hành ở nhiệt độ 65°C trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 X SSC (có thành phần NaCl 750 mM, trinati xitrat 75 mM), natri phosphat 50 mM (độ pH = 7,6), 5 X dung dịch Denhardt (có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinyl pyrrolidon 0,2%), dextran sulfat 10%, và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính sử dụng bộ lọc trên đó ADN thu được từ khuẩn lạc hoặc vết tan đã được cố định, và bộ lọc được rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC (nước muối-natri xitrat) có nồng độ gấp từ 0,1 đến 2 lần (thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM, natri xitrat 15 mM).

Cụ thể, các điều kiện này có nghĩa là, ví dụ:

Phân tử axit nucleic được sử dụng để sản xuất enzym sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể là phân tử axit nucleic được cải biến theo cách bảo toàn so với phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ mã hóa enzym tự

nhiên. "Phân tử axit nucleic được cải biến theo cách bảo toàn so với phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ mã hóa enzym tự nhiên" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin giống hoặc gần như giống với trình tự axit amin của enzym tự nhiên. "Trình tự axit amin gần như giống với trình tự axit amin của enzym tự nhiên" được dùng để chỉ trình tự axit amin có hoạt tính enzym gần như giống với hoạt tính của enzym tự nhiên. Do sự suy biến của mã di truyền, nên nhiều trình tự bazơ tương đương về mặt chức năng mã hóa trình tự axit amin bất kỳ đã cho. Ví dụ, tất cả các codon GCA, GCC, GCG và GCU đều mã hóa axit amin alanin. Do vậy, ở tất cả các vị trí trong đó alanin được xác định bởi codon GCA, codon này có thể được thay đổi thành GCC, GCG hoặc GCU mà không thay đổi alanin được mã hóa. Tương tự, liên quan đến axit amin mà có thể được mã hóa bởi nhiều codon, ở tất cả các vị trí mà trong đó axit amin được xác định bởi codon, codon này có thể được thay đổi thành codon bất kỳ khác mã hóa axit amin này, mà không làm thay đổi axit amin cụ thể được mã hóa. Sự thay đổi này trong trình tự bazơ là "đột biến câm", là một loại đột biến được biến đổi theo cách bảo toàn. Tất cả các trình tự bazơ mã hóa polypeptit trong bản mô tả này còn bao gồm tất cả các đột biến câm có thể có của axit nucleic. Đột biến câm bao gồm "đột biến thể câm" mà trong đó axit amin được mã hóa không bị thay đổi, và trường hợp mà trong đó axit nucleic ban đầu không mã hóa axit amin (ví dụ, đột biến ở phần intron, đột biến ở vùng chưa được dịch mã khác và các đột biến tương tự). Khi axit nucleic nhất định mã hóa axit amin, thì đột biến câm có ý nghĩa giống như đột biến thể câm. Trong bản mô tả này, "đột biến thể câm" dùng để chỉ sự thay thế trình tự bazơ mã hóa một axit amin nhất định bằng một trình tự bazơ khác mã hóa cùng một axit amin, trong trình tự bazơ. Dựa trên hiện tượng suy biến trong mã di truyền,

trong trường hợp có nhiều trình tự bazơ mã hóa một axit amin nhất định (ví dụ, glyxin và các axit amin tương tự), đột biến thể câm này là có thể xảy ra. Do vậy, polypeptit có trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự bazơ được tạo ra bởi đột biến thể câm sẽ có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của polypeptit ban đầu. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, cần phải hiểu rằng mỗi codon trong axit nucleic (ngoại trừ đối với AUG là codon duy nhất thường mã hóa methionin, và TGG là codon duy nhất thường mã hóa tryptophan) có thể được cải biến để tạo ra cùng một phân tử về mặt chức năng. Do vậy, mỗi đột biến câm của axit nucleic mã hóa polypeptit được bao gồm hoàn toàn trong mỗi trình tự đã nêu. Tốt hơn nếu, sự cải biến này có thể được tiến hành sao cho tránh được đột biến thể của xystein, một axit amin ảnh hưởng nhiều đến hình dạng của polypeptit.

Trình tự bazơ mã hóa enzym được sử dụng theo sáng chế có thể được thay đổi tuân theo cách sử dụng codon ở sinh vật mà trình tự này được đưa vào để biểu hiện. Các sử dụng codon phản ánh cách sử dụng ở gen mà được biểu hiện cao ở sinh vật. Ví dụ, khi dự định biểu hiện một trình tự ở *Escherichia coli*, thì trình tự này có thể được làm cho tối ưu hóa để biểu hiện ở *Escherichia coli* theo bảng sử dụng codon đã được công bố (ví dụ, Sharp, et al., Nucleic Acids Research 16, No.17, p.8207 (1988)).

Vectơ biểu hiện có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ đã được cải biến như nêu trên. Phương pháp tạo ra vectơ biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự axit nucleic cụ thể là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi phân tử axit nucleic được đề cập đến trong bản mô tả này, "vectơ" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có thể chuyển trình tự bazơ mục tiêu vào

tế bào mục tiêu. Ví dụ về các vector này gồm vector có thể tự sao chép trong tế bào mục tiêu, hoặc có thể được kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào mục tiêu, và có đoạn khởi đầu ở vị trí thích hợp để phiên mã trình tự bazơ đã được cải biến. Trong bản mô tả này, vector có thể là plasmit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vector biểu hiện" dùng để chỉ vector có thể biểu hiện trình tự bazơ đã được cải biến (tức là trình tự bazơ mã hóa enzym đã được cải biến) trong tế bào mục tiêu. Ngoài trình tự bazơ đã được cải biến, vector biểu hiện còn chứa nhiều yếu tố điều hòa khác nhau như đoạn khởi đầu điều hòa sự biểu hiện của trình tự bazơ này và, nếu cần, yếu tố cần thiết để sao chép trong tế bào mục tiêu và chọn lọc thể tái tổ hợp (ví dụ, điểm khởi đầu sao chép (*ori*), và gen đánh dấu chọn lọc như gen kháng thuốc). Trong vector biểu hiện, trình tự bazơ đã được cải biến được liên kết theo cách có điều khiển sao cho nó được phiên mã và được dịch mã. Yếu tố điều hòa bao gồm đoạn khởi đầu, đoạn kết thúc và đoạn tăng cường. Ngoài ra, khi dự định tiết enzym đã biểu hiện ra bên ngoài tế bào, thì trình tự bazơ mã hóa peptit tín hiệu tiết được liên kết phía trên của trình tự bazơ đã được cải biến trong khung đọc chính xác. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ rằng cả loại vector biểu hiện được sử dụng để đưa vào sinh vật cụ thể (ví dụ vi khuẩn), lẫn loại yếu tố điều hòa và các yếu tố khác được sử dụng trong vector biểu hiện, có thể thay đổi phụ thuộc vào tế bào mục tiêu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đoạn kết thúc" là trình tự được đặt phía dưới vùng mã hóa protein, và tham gia vào việc kết thúc phiên mã trong quá trình phiên mã trình tự bazơ thành mARN, và trong quá trình bổ sung trình tự poly A. Đã biết rằng đoạn kết thúc ảnh hưởng đến mức biểu hiện của gen do liên quan đến sự ổn định của mARN.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đoạn khởi đầu" dùng để chỉ vùng trên ADN mà xác định vị trí khởi đầu phiên mã của gen, và trực tiếp điều hòa tần suất phiên mã, và là trình tự bazơ mà ARN polymeraza liên kết với, nhờ đó, khởi đầu sự phiên mã. Vì vùng của đoạn khởi đầu thường là vùng khoảng 2 kbp hoặc ít hơn phía trên của exon thứ nhất của vùng mã hóa protein giả định trong nhiều trường hợp, nên khi vùng mã hóa protein trong trình tự bazơ của hệ gen được dự đoán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích ADN, vùng đoạn khởi đầu có thể là giả định. Vùng đoạn khởi đầu giả định thay đổi theo mỗi gen cấu trúc, và thường ở phía trên của gen cấu trúc mà không bị giới hạn, và có thể ở phía dưới của gen cấu trúc. Tốt hơn nếu, vùng đoạn khởi đầu giả định có mặt phía trên khoảng 2 kbp hoặc ít hơn của điểm khởi đầu dịch mã exon thứ nhất.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đoạn tăng cường" có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả biểu hiện của gen mục tiêu. Đoạn tăng cường như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể sử dụng nhiều đoạn tăng cường, hoặc chỉ sử dụng một đoạn tăng cường, hoặc có thể hoàn toàn không sử dụng đoạn tăng cường.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "được liên kết theo cách có điều khiển" dùng để chỉ khi trình tự bazơ mong muốn được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã (ví dụ, đoạn khởi đầu, đoạn tăng cường và các đoạn tương tự) hoặc trình tự điều hòa dịch mã mà tác động đến sự biểu hiện (tức là, hoạt động). Để cho đoạn khởi đầu được liên kết theo cách có điều khiển với gen, thông thường, đoạn khởi đầu được đặt ngay phía trên của gen này, mà không nhất thiết là đoạn khởi đầu được đặt liền kề với gen này.

Để liên kết theo cách có điều khiển trình tự axit nucleic đã được cải biến



với yếu tố điều hòa đã nêu ở trên, trong một số trường hợp gen mã hóa enzym phải được xử lý. Các ví dụ bao gồm trường hợp trong đó khoảng cách giữa đoạn khởi đầu và vùng mã hóa quá dài, và dự đoán rằng hiệu quả phiên mã bị giảm, trường hợp trong đó khoảng cách giữa vị trí liên kết ribosom và codon khởi đầu dịch mã là không thích hợp, và các trường hợp tương tự. Ví dụ về phương pháp xử lý bao gồm cắt bằng enzym giới hạn, cắt bằng exonucleaza như Bal31 và ExoIII, hoặc đưa vào đột biến định hướng điểm bằng cách sử dụng ADN sợi đơn như M13 hoặc PCR.

Sau đó, vector biểu hiện đã tạo ra như nêu trên được đưa vào tế bào, nhờ đó enzym mục tiêu được biểu hiện.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "sự biểu hiện" của enzym được dùng để chỉ sự phiên mã và sự dịch mã in vivo hoặc in vitro của trình tự bazơ mã hóa enzym, và sản xuất enzym đã được mã hóa.

Tế bào trong đó vector biểu hiện được đưa vào (còn được gọi là vật chủ) bao gồm tế bào chưa có nhân điển hình và tế bào có nhân điển hình. Tế bào trong đó vector biểu hiện được đưa vào có thể được chọn lọc một cách dễ dàng, tính đến nhiều điều kiện khác nhau như để biểu hiện enzym mục tiêu, dễ nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng và độ an toàn. Ví dụ về các tế bào này bao gồm vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Ví dụ về tế bào được ưu tiên hơn bao gồm vi sinh vật ưa nhiệt trung bình (ví dụ, nấm men, mốc, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*). Tế bào có thể là tế bào vi sinh vật, hoặc có thể là tế bào thực vật hoặc động vật. Phụ thuộc vào tế bào được sử dụng, enzym thủy phân tinh bột có thể là enzym đã được xử lý sau dịch mã.

Trong phương pháp theo sáng chế, kỹ thuật đưa vector biểu hiện vào tế



bào có thể là kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ về kỹ thuật như vậy bao gồm, ví dụ, biến nạp, tải nạp và chuyển nhiễm. Kỹ thuật đưa vào phân tử axit nucleic này là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và đã biết rõ và được mô tả, ví dụ, trong Ausubel F.A., et al. ed. (1988), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, NY; Sambrook J, et al. (1987) *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, và Bessatsu Jikken-igaku "Idenshidounyu & Hatsugen kaiseki jikkenhou", Yodosha, 1997.

### 1.3 Các nguyên liệu khác

Trong quá trình sản xuất các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym, nguyên liệu bất kỳ thường được sử dụng để xử lý bằng enzym có thể được sử dụng với điều kiện nó không cản trở tác động của enzym. Ví dụ về nguyên liệu khác như vậy bao gồm muối và chất đệm. Vì thông thường đã biết rằng tốc độ của phản ứng enzym có thể được cải thiện đáng kể bằng cách bổ sung muối đặc hiệu thích hợp với mỗi enzym, tốt hơn nếu bổ sung muối đặc hiệu như vậy. Có thể rút ngắn thời gian xử lý bằng cách bổ sung muối thích hợp như vậy vào mỗi enzym. Ví dụ về hỗn hợp của enzym và muối bao gồm hỗn hợp của amyloglucosidaza và ion kim loại (ví dụ, ion natri, ion kali, ion canxi hoặc ion magie). Nhờ thử nghiệm bởi các tác giả sáng chế này, ví dụ, trong trường hợp xử lý tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý bằng amyloglucosidaza (ví dụ, "OPTIDEX L-400" thu được từ *Aspergillus niger*, được sản xuất bởi Genencor), tốc độ phân giải của tinh bột trong hệ thống, trong đó bổ sung 100 phần triệu (về ion kim loại) natri clorua, hoặc natri sulfat, hoặc kali clorua, hoặc canxi clorua, hoặc magie clorua, tăng từ 1,5 đến 2 lần so với hệ thống trong đó không bổ sung ion kim loại.

## 2. Phương pháp sản xuất hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym

Các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym được sản xuất bằng cách xử lý các hạt tinh bột bằng enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza. Chi tiết mỗi bước sẽ được nêu dưới đây.

### 2.1 Điều chế huyền phù

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, ví dụ, các hạt tinh bột, enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza, chất đệm, và dung môi hòa tan chúng được sử dụng làm nguyên liệu chính. Mặc dù tất cả các nguyên liệu này thường được bổ sung tại thời điểm bắt đầu phản ứng, nhưng nguyên liệu bất kỳ trong số các nguyên liệu này có thể được bổ sung tiếp trong quá trình phản ứng. Dung môi được sử dụng trong phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là dung môi bất kỳ với điều kiện nó là dung môi không làm suy yếu hoạt tính enzym của enzym được sử dụng. Dung môi điển hình là nước (ví dụ, nước trao đổi ion, nước được tinh chế và nước máy). Dung môi có thể là lượng ẩm của chất lỏng tế bào đã được nghiền vụn thu được kết hợp với enzym trong quá trình điều chế enzym.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, trước tiên, dung dịch phản ứng được điều chế. Dung dịch phản ứng có thể thu được, ví dụ, bằng cách bổ sung các hạt tinh bột và enzym thủy phân tinh bột hoặc glycosyltransferaza vào dung môi thích hợp. Ví dụ, enzym có thể được bổ sung sau khi điều chế huyền phù tinh bột bằng cách tạo huyền phù các hạt tinh bột trong dung môi (ví dụ, nước hoặc dung dịch đệm). Theo cách khác, dung dịch phản ứng có thể được điều chế bằng cách trộn huyền phù chứa các hạt tinh bột với dung dịch chứa enzym. Chất đệm bất kỳ có thể được bổ sung một cách tùy ý vào dung dịch

phản ứng này nhằm mục đích điều chỉnh độ pH với điều kiện nó không ức chế phản ứng enzym. Lưu ý rằng mặc dù các hạt tinh bột không được hòa tan nhưng được tạo huyền phù trong dung dịch phản ứng, nó được gọi là dung dịch phản ứng, vì các thành phần khác như enzym được hòa tan trong đó.

Độ pH của dung dịch phản ứng có thể được điều chỉnh tùy ý với điều kiện nó là độ pH mà tại đó enzym được sử dụng có thể gây ra hoạt tính. Độ pH của dung dịch phản ứng tốt hơn nếu là xung quanh độ pH tối ưu của enzym được sử dụng. Độ pH của dung dịch phản ứng thường là khoảng 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn nếu là khoảng 3 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 4 hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 5 hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 6 hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 7 hoặc lớn hơn. Độ pH của dung dịch phản ứng thường là khoảng 13 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nếu là khoảng 12 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 11 hoặc nhỏ hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 10 hoặc nhỏ hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 9 hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 8 hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án, độ pH của dung dịch phản ứng thường trong phạm vi độ pH tối ưu  $\pm 3$ , tốt hơn nếu nằm trong phạm vi độ pH tối ưu  $\pm 2$ , tốt hơn nữa nếu nằm trong phạm vi độ pH tối ưu  $\pm 1$ , và tốt nhất nếu trong phạm vi độ pH tối ưu  $\pm 0,5$ , của enzym được sử dụng.

Lượng của các hạt tinh bột trong dung dịch phản ứng có thể được điều chỉnh tùy ý với điều kiện nó là lượng cho phép phản ứng enzym xảy ra. Lượng của các hạt tinh bột trong dung dịch phản ứng tốt hơn nếu là khoảng 5% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 10% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 20% khối lượng hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 30% khối lượng hoặc lớn hơn. Lượng của các hạt tinh bột trong dung

dịch phản ứng tốt hơn nếu là khoảng 60% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu khoảng 50% khối lượng hoặc nhỏ hơn, vẫn tốt hơn nữa nếu khoảng 40% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 35% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Lượng enzym trong dung dịch phản ứng có thể được điều chỉnh tùy ý với điều kiện nó là lượng cho phép phản ứng enzym xảy ra. Lượng enzym tốt hơn nếu là lượng đủ để thực hiện phản ứng trong khoảng thời gian hợp lý. Khi lượng enzym tăng, thời gian cần cho phản ứng trở nên ngắn hơn. Khi lượng enzym giảm, thời gian cần cho phản ứng trở nên dài hơn. Khi lượng enzym này là quá lớn, chi phí tăng quá nhiều và enzym đôi khi có thể bị kết tụ lại tạo thành chất kết tủa. Do vậy, tốt hơn nếu điều chỉnh lượng enzym một cách thích hợp.

Lượng enzym trong dung dịch phản ứng tốt hơn nếu là khoảng 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 0,05% khối lượng hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa nếu là khoảng 0,1% khối lượng hoặc lớn hơn, tính theo hàm lượng chất rắn của các hạt tinh bột. Lượng enzym trong dung dịch phản ứng tốt hơn nếu là khoảng 10% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa nếu là khoảng 1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo hàm lượng chất rắn của các hạt tinh bột. Lượng enzym trong dung dịch phản ứng có thể là lượng đủ để cho phép phản ứng enzym xảy ra. Do vậy, không cần thiết kiểm tra kỹ về hoạt tính (số lượng đơn vị) của enzym.

## 2.2 Phản ứng enzym

Tiếp theo, dung dịch phản ứng được phản ứng một cách tùy ý bằng cách gia nhiệt sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiệt độ

dung dịch trong bước phản ứng có thể là nhiệt độ bất kỳ với điều kiện nó là nhiệt độ mà tại đó các hạt tinh bột gần như không bị vỡ. Nhiệt độ phản ứng tốt hơn nếu là nhiệt độ mà tại đó enzym được sử dụng có thể đủ gây ra hoạt tính và đủ giữ được hoạt tính (tức là, ít có khả năng bị làm bất hoạt hơn). Nhiệt độ của dung dịch trong bước phản ứng này tốt hơn nếu là nhiệt độ mà tại đó khoảng 50% hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa nếu khoảng 80% hoặc cao hơn, hoạt tính của enzym có trong dung dịch trước phản ứng vẫn còn sau thời gian phản ứng định trước. Ví dụ, nhiệt độ này có thể là nhiệt độ tối ưu  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , tốt hơn nữa nếu là nhiệt độ tối ưu  $\pm 5$ , tốt hơn nữa nếu là nhiệt độ tối ưu  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ , và tốt nhất nếu độ pH là độ pH tối ưu  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , của enzym được sử dụng. Nhiệt độ phản ứng tốt hơn nếu là khoảng  $10^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $10^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $15^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $20^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng  $30^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn, và tốt nhất nếu là  $40^{\circ}\text{C}$  hoặc cao hơn. Nhiệt độ phản ứng tốt hơn nếu là khoảng  $70^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $65^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng  $60^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn, và tốt nhất nếu là  $55^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn.

Thời gian phản ứng có thể được điều chỉnh tùy ý tính đến nhiệt độ phản ứng, lượng enzym so với các hạt tinh bột. Thời gian phản ứng tốt hơn nếu có thể là trong khoảng 1 giờ hoặc lâu hơn, ví dụ, khoảng 2 giờ hoặc lâu hơn, khoảng 3 giờ hoặc lâu hơn, khoảng 6 giờ hoặc lâu hơn, và khoảng 12 giờ hoặc lâu hơn. Mặc dù không có giới hạn trên cụ thể về thời gian phản ứng, thời gian phản ứng tốt hơn nếu là khoảng 72 giờ hoặc ngắn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 48 giờ hoặc ngắn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 36 giờ hoặc ngắn hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 24 giờ hoặc ngắn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng

20 giờ hoặc ngắn hơn.

### 2.3 Sau xử lý

Các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể được sử dụng ngay phụ thuộc vào ứng dụng. Tuy nhiên, tốt hơn nếu enzym được sử dụng và sacarin được rửa giải bởi sự thủy phân bằng enzym được loại bỏ bằng cách rửa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym, và sau đó là khử nước. Việc rửa và khử nước các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể được tiến hành bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Rửa và khử nước các hạt tinh bột là các phương pháp thông thường được sử dụng để điều chế tinh bột, và được thực hiện phổ biến. Ngoài ra, tốt hơn nếu thu được các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym mục tiêu bằng cách làm khô tinh bột sau khi khử nước. Việc làm khô tinh bột sau khi khử nước có thể được tiến hành bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

### 2.4 Cải biến hóa học

Các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể được cải biến hóa học, nếu muốn. Không chỉ trong trường hợp các hạt tinh bột được sử dụng trong quá trình xử lý enzym là các hạt tinh bột chưa qua xử lý hoặc các hạt tinh bột đã được xử lý vật lý, mà còn trong cả trường hợp các hạt tinh bột của một số tinh bột được cải biến hóa học được sử dụng, có thể được cải biến hóa học mà khác với các cải biến hóa học đã được áp dụng cho tinh bột được cải biến hóa học. Ví dụ về cải biến hóa học bao gồm axetyl hóa, liên kết ngang adipat, oxy hóa, tẩy trắng, liên kết ngang phosphat, xử lý bằng axit octenyl succinic, hydroxypropyl hóa, phosphoryl hóa, và monoeste hóa axit phosphoric. Các phương pháp cải biến hóa học này là đã được biết rõ trong lĩnh vực. Các cải biến hóa học này có thể được tiến hành đến mức độ bất kỳ miễn là chúng nằm



trong phạm vi được cho phép bởi luật vệ sinh an toàn thực phẩm của Nhật Bản. Ở Nhật Bản, để cho tinh bột được cải biến hóa học được chấp thuận là chất phụ gia thực phẩm, cần phải phân tích nhiều chất hóa học khác nhau trong mẫu tinh bột theo phương pháp kiểm tra độ tinh khiết được mô tả trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội và kết quả phân tích thu được đáp ứng các tiêu chuẩn sau:

(a) Tinh bột kép adipat axetyl hóa: hàm lượng của nhóm axit adipic sẽ là 0,135% hoặc thấp hơn và hàm lượng của nhóm axetyl sẽ là 2,5% hoặc thấp hơn;

(b) Tinh bột oxy hóa axetyl hóa: hàm lượng của nhóm axetyl sẽ là 2,5% hoặc thấp hơn và hàm lượng của nhóm carboxyl sẽ là 1,3% hoặc thấp hơn;

(c) Tinh bột kép phosphat axetyl hóa: hàm lượng của nhóm axetyl sẽ là 2,5% hoặc thấp hơn và hàm lượng của phospho sẽ là 0,14% hoặc thấp hơn đối với P;

(d) Tinh bột natri octenyl suxinat: hàm lượng của nhóm axit octenyl suxinic sẽ là 3,0% hoặc thấp hơn;

(e) Tinh bột axetat: hàm lượng của nhóm axetyl sẽ là 2,5% hoặc thấp hơn;

(f) Tinh bột oxy hóa: hàm lượng của nhóm carboxyl sẽ là 1,1% hoặc thấp hơn;

(g) Tinh bột kép hydroxypropyl phosphat: hàm lượng của nhóm hydroxypropyl sẽ là 7,0% hoặc thấp hơn và hàm lượng của phospho sẽ là 0,14% hoặc thấp hơn đối với P;

(h) Tinh bột hydroxypropyl: hàm lượng của nhóm hydroxypropyl sẽ là 7,0% hoặc thấp hơn;

(i) Tinh bột kép phosphat: hàm lượng của phospho sẽ là 0,5% hoặc thấp hơn đối với P;

(j) Tinh bột đơn phosphat: hàm lượng của phospho sẽ là 0,5% hoặc thấp hơn đối với P;

(k) Tinh bột kép phosphat phosphat hóa: hàm lượng của phospho sẽ là 0,5% hoặc thấp hơn đối với P;

(l) Tinh bột được tẩy trắng: hàm lượng của nhóm carboxyl sẽ là 0,1% hoặc thấp hơn, kết quả thử nghiệm của “Thử nghiệm xác nhận (3)” của tinh bột oxy hóa được mô tả trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội sẽ là âm tính, và điều này sẽ được giải thích một cách hợp lý rằng sự thay đổi các tính chất, như độ nhớt, của tinh bột không phải do quá trình oxy hóa gây ra. Đối với các quốc gia ngoài Nhật Bản, việc xử lý hóa học ở mức độ bất kỳ có thể được tiến hành với điều kiện nó nằm trong phạm vi được cho phép trong quốc gia đó. Một số loại cải biến hóa học có thể được sử dụng kết hợp.

## 2.5 Xử lý vật lý

Các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể được xử lý vật lý, nếu muốn. Không chỉ trong trường hợp các hạt tinh bột được sử dụng trong quá trình xử lý enzym là các hạt tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, mà còn cả trong trường hợp các hạt tinh bột đã trải qua một số quy trình xử lý vật lý được sử dụng, có thể tiến hành xử lý vật lý khác với quy trình xử lý vật lý này. Ví dụ về quy trình xử lý vật lý bao gồm xử lý nhiệt-hơi ẩm và xử lý ức chế bởi nhiệt.

“Xử lý nhiệt-hơi ẩm” được dùng để chỉ sự gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 125°C ở trạng thái độ ẩm thấp, trong đó tinh bột không bị gelatin hóa trong đồ chứa kín trong điều kiện độ ẩm tương đối khoảng 100%. “Trạng thái độ ẩm thấp trong đó tinh bột không bị gelatin hóa” biểu thị, ví dụ, hàm ẩm khoảng 50% hoặc thấp hơn. Trạng thái độ ẩm thấp trong đó tinh bột không bị gelatin hóa có thể là, ví dụ, hàm ẩm khoảng 35% hoặc thấp hơn, khoảng 30% hoặc thấp hơn, khoảng 25% hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 20% hoặc thấp hơn. Thời gian gia nhiệt của quy trình xử lý nhiệt-hơi ẩm có thể thay đổi phụ thuộc vào phương pháp xử lý nhiệt-hơi ẩm. Ví dụ, xử lý nhiệt-hơi ẩm được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Công bố patent Nhật Bản số 6-145203, việc xử lý nhiệt được thực hiện bằng cách trước tiên giảm áp đến áp suất nằm trong khoảng từ 0 đến 500 torr (nằm trong khoảng từ 0 đến 66,661 kPA), và sau đó đưa hơi đã được tăng áp vào, sau đó là giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 150°C trong thời gian từ 2 phút đến 120 phút. Xử lý nhiệt-hơi ẩm được mô tả trong nhiều tài liệu khác nhau và có thể được tiến hành theo phương pháp xử lý nhiệt-hơi ẩm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Xử lý nhiệt-hơi ẩm được mô tả, ví dụ, trong Công bố patent Nhật Bản số 6-145203, Công bố patent Nhật Bản số 4-130102, A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals 2010-2 (P.37-42) và các tài liệu tương tự. Nhiệt độ, thời gian và các thông số tương tự của quy trình xử lý nhiệt-hơi ẩm có thể được điều chỉnh một cách thích hợp phụ thuộc vào tinh bột đích và tính chất vật lý của chúng.

“Việc xử lý ức chế bởi nhiệt” được dùng để chỉ việc cấu trúc tinh thể của các hạt tinh bột được tăng cường bằng cách cho các hạt tinh bột đã được làm khô đến hàm lượng nước cực kỳ thấp vào quy trình xử lý nhiệt khô. “Các

hạt tinh bột được làm khô đến hàm lượng nước cực kỳ thấp” được dùng để chỉ các hạt tinh bột mà hàm ẩm của nó nhỏ hơn khoảng 1%. Hàm ẩm của các hạt tinh bột được xử lý ức chế bởi nhiệt tốt hơn nếu là khoảng 0%. Phương pháp làm khô các hạt tinh bột đến hàm lượng nước cực kỳ thấp được mô tả, ví dụ, trong JP-A-2008-223032 và có thể là, ví dụ, phương pháp trong đó độ pH của các hạt tinh bột được điều chỉnh đến độ pH = 7,0 hoặc cao hơn và sau đó thực hiện khử nước cho đến khi hàm ẩm đạt đến thấp hơn khoảng 1%. Trong trường hợp làm khô đến hàm lượng nước thấp, độ pH tốt hơn nếu là 7 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu lớn hơn 8, vẫn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 7,5 đến 10,5, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 8 đến 9,5. Sự khử nước có thể là khử nước bằng nhiệt hoặc khử nước không bằng nhiệt. Trong trường hợp xử lý nhiệt khô, quy trình xử lý nhiệt được thực hiện ở nhiệt độ đủ trong thời gian đủ để ức chế tinh bột. Tốt hơn nếu, quy trình xử lý nhiệt được thực hiện ở nhiệt độ đủ trong thời gian đủ để làm cho tinh bột không kết tụ. Nhiệt độ gia nhiệt đối với quy trình xử lý ức chế bởi nhiệt tốt hơn nếu là cao hơn 100°C. Nhiệt độ xử lý nhiệt tốt hơn nếu là khoảng 200°C hoặc thấp hơn. Nhiệt độ gia nhiệt đối với quy trình xử lý ức chế bởi nhiệt tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 120°C đến 180°C, đặc biệt tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 140°C đến 160°C, và tốt nhất nếu là khoảng 160°C. Mức độ ức chế tùy thuộc vào độ pH, nhiệt độ gia nhiệt và thời gian gia nhiệt. Khi độ pH trở nên cao hơn, thu được tinh bột được ức chế cao hơn nhiều. Khi nhiệt độ của quá trình xử lý nhiệt trở nên cao hơn, thu được tinh bột được ức chế cao hơn nhiều. Khi thời gian xử lý nhiệt trở nên dài hơn, thu được tinh bột được ức chế cao hơn nhiều. Thời gian xử lý nhiệt đối với quy trình xử lý ức chế bởi nhiệt có thể là, ví dụ, khoảng 3 giờ hoặc lâu hơn, và tốt hơn nếu là khoảng 20 giờ hoặc ngắn hơn. Quy trình xử lý ức chế bởi

nhiệt được bộc lộ trong nhiều tài liệu khác nhau và có thể được tiến hành theo phương pháp xử lý ức chế bởi nhiệt bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Quy trình xử lý ức chế bởi nhiệt được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 6221420, Công bố đơn quốc tế số WO 95/04082, và Công bố patent Nhật Bản số 2008-223032. Nhiệt độ, thời gian, và các thông số tương tự của quy trình xử lý ức chế bởi nhiệt có thể được điều chỉnh một cách thích hợp phụ thuộc vào tinh bột đích và tính chất vật lý của chúng. Quy trình xử lý vật lý có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực.

Ví dụ về tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm bao gồm, ví dụ, “Delicastar series”, “Naturastar series”, và “AMYLOGEL” được sản xuất bởi SANWA CORNSTARCH CO., LTD.; và “ROADSTER” được sản xuất bởi Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd. Ví dụ về tinh bột được ức chế bằng nhiệt gồm “NOVATION series” được sản xuất bởi National Starch Corp.

### 3. Các đặc tính của các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế

Theo phương án cụ thể, tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế là tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao, và tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C.

Theo phương án cụ thể khác, tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế là tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao; tinh bột đã xử lý bằng enzym là tinh bột thu được bằng cách xử lý các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý bằng enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện các hạt tinh bột không được hòa tan; tinh bột đã xử lý bằng enzym không được cải biến trên các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza; và tinh

bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có môđun Young cao hơn môđun Young của tinh bột chưa qua xử lý hoặc ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của tinh bột chưa qua xử lý, khi được xác định bởi lưu biến kế.

### 3.1 Độ nhớt

Đã biết rằng khi tinh bột được gia nhiệt cùng với lượng nước định trước hoặc lớn hơn, các hạt tinh bột thường gây ra hiện tượng gelatin hóa như sự trương nở, tăng độ trong suốt, và tăng độ nhớt. Các hạt tinh bột bị gãy vỡ khi gia nhiệt tiếp. Để xác định sự thay đổi độ nhớt kèm theo một chuỗi các hiện tượng này, phương pháp amylograph được tạo ra bởi Brabender Inc. là thích hợp và được sử dụng một cách rộng rãi, mặc dù có một số phương pháp khác. Amylograph là phương pháp trong đó đối tượng được gia nhiệt ở tốc độ định trước và mối quan hệ giữa nhiệt độ và độ nhớt của của đối tượng được ghi lại. Tức là, các hạt tinh bột trải qua sự trương nở kèm theo gia nhiệt, trong khi sự biểu lộ của độ nhớt và tăng độ nhớt xuất hiện trong amylograph. Sau đó, khi sự trương nở của các hạt tinh bột trở nên tối đa, độ nhớt cũng đạt đến đỉnh. Độ nhớt này được gọi là độ nhớt tối đa. Việc gia nhiệt tiếp làm vỡ các hạt tinh bột và đồng thời làm giảm độ nhớt. Mức độ giảm độ nhớt này được gọi là sự phân hủy. Đường cong độ nhớt thu được bằng amylograph này thay đổi phụ thuộc vào nguồn gốc và phương pháp sản xuất tinh bột, và là phương pháp xác định cho thấy các đặc điểm của tinh bột.

Ví dụ, phương pháp xác định bằng amylograph được thực hiện như sau. Huyền phù tinh bột được pha chế trong 450 ml nước để thu được lượng định trước của các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym (ví dụ, hàm lượng tinh bột lúa mì là 8,5% khối lượng, hàm lượng tinh bột ngô là 7,0% khối lượng, và hàm lượng tinh bột sắn là 6,0% khối lượng, tính theo chất khô), được đặt trong đồ



chứa mẫu, và sau đó được làm ấm đến nhiệt độ 50°C trong khi quay chúng. Sau đó, huyền phù được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C ở tốc độ 1,5°C/phút và được giữ ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút, sau đó được làm nguội ở tốc độ 1,5°C/phút. Phương pháp xác định được thực hiện bằng cách sử dụng amylograph VISCOGRAPH-E do Brabender Inc. sản xuất trong điều kiện số vòng quay của đồ chứa mẫu là 75 vòng/phút và hộp xác định là 700 cmg. Trong đó, độ nhớt đạt đến đỉnh được đánh giá là độ nhớt tối đa, và độ chênh lệch giữa độ nhớt tối đa và độ nhớt ở thời điểm sau khi duy trì ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút được xem là sự phân hủy. Độ chênh lệch này còn được gọi là độ nhớt phân hủy. Khi độ chênh lệch giữa độ nhớt tối đa và độ nhớt ở thời điểm sau khi duy trì ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút là nhỏ hơn 100 BU, thì có thể nói rằng tinh bột này không có “sự phân hủy”.

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được điều chế từ tinh bột chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tốt hơn nếu các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có độ nhớt tối đa bằng khoảng 50% hoặc cao hơn (tốt hơn nữa nếu là khoảng 60% hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 70% hoặc cao hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 80% hoặc cao hơn, khoảng 90% hoặc cao hơn, hoặc khoảng 100% hoặc cao hơn) độ nhớt tối đa của tinh bột chưa qua xử lý, khi được xác định bởi phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên. Không có giới hạn trên cụ thể của độ nhớt tối đa của tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế. Ví dụ, độ nhớt tối đa của tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể là khoảng 300% hoặc thấp hơn, khoảng 250% hoặc thấp hơn, khoảng 200% hoặc thấp hơn, khoảng 150% hoặc thấp hơn, khoảng 110% hoặc thấp hơn, và khoảng 100% hoặc thấp hơn độ nhớt tối đa của tinh bột chưa

qua xử lý, khi được xác định bởi phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên. Ví dụ, tốt hơn nếu tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có độ nhớt nằm trong khoảng từ 70% đến 200% (tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 80% đến 200%) độ nhớt của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý.

Ví dụ, đối với tinh bột lúa mì, độ nhớt tối đa của tinh bột lúa mì tự nhiên khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên nằm trong khoảng từ 550 BU đến 650 BU. Mặt khác, trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột lúa mì chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể tốt hơn nếu là khoảng 400 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 420 BU hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 450 BU hoặc cao hơn, tốt nhất nếu là khoảng 500 BU hoặc cao hơn, ví dụ, khoảng 550 BU hoặc cao hơn, khoảng 570 BU hoặc cao hơn, khoảng 600 BU hoặc cao hơn, hoặc khoảng 650 BU hoặc cao hơn. Theo phương án cụ thể, có thể tạo ra độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên đến khoảng 660 BU hoặc cao hơn, khoảng 670 BU hoặc cao hơn, hoặc khoảng 700 BU hoặc cao hơn. Độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể là, ví dụ, khoảng 900 BU hoặc thấp hơn, khoảng 850 BU hoặc thấp hơn, khoảng 800 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 750 BU hoặc thấp hơn.

Ví dụ, đối với tinh bột ngô, độ nhớt tối đa của tinh bột ngô tự nhiên khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên nằm

trong khoảng từ 400 BU đến 500 BU. Mặt khác, trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột ngô chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột ngô được xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể tốt hơn nếu là khoảng 250 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 270 BU hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 300 BU hoặc cao hơn, tốt nhất nếu là khoảng 350 BU hoặc cao hơn, ví dụ, khoảng 400 BU hoặc cao hơn, khoảng 420 BU hoặc cao hơn, khoảng 440 BU hoặc cao hơn, hoặc khoảng 450 BU hoặc cao hơn. Độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể là, ví dụ, khoảng 600 BU hoặc thấp hơn, khoảng 550 BU hoặc thấp hơn, khoảng 520 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 500 BU hoặc thấp hơn.

Ví dụ, đối với tinh bột sắn, độ nhớt tối đa của tinh bột sắn tự nhiên khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên nằm trong khoảng từ 700 BU đến 800 BU. Mặt khác, trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột sắn chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột sắn được xử lý bằng enzym theo sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể tốt hơn nếu là khoảng 500 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 520 BU hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 530 BU hoặc cao hơn, tốt nhất nếu là khoảng 550 BU hoặc cao hơn, ví dụ, khoảng 600 BU hoặc cao hơn, khoảng 620 BU hoặc cao hơn, khoảng 630 BU hoặc cao hơn, hoặc khoảng 650 BU hoặc cao hơn. Độ nhớt tối đa của các hạt tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym theo

sáng chế khi được xác định bằng phương pháp amylograph trong các điều kiện nêu trên có thể là, ví dụ, khoảng 900 BU hoặc thấp hơn, khoảng 850 BU hoặc thấp hơn, khoảng 800 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 770 BU hoặc thấp hơn.

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được điều chế từ tinh bột chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có sự phân hủy khi được xác định bằng phương pháp amylograph. Một số tinh bột thông thường không có sự phân hủy, trong khi đó, các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có sự phân hủy.

Ví dụ, trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì, tinh bột ngô hoặc tinh bột sắn và không được cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có độ nhớt phân hủy khoảng 100 BU hoặc cao hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 100 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 120 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 130 BU hoặc cao hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 150 BU hoặc cao hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì và không được cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 500 BU hoặc thấp hơn, khoảng 450 BU hoặc thấp hơn, khoảng 400 BU hoặc thấp hơn, khoảng 350 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 300 BU hoặc thấp hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện việc cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 100 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 110 BU hoặc cao hơn, vẫn tốt hơn nữa nếu là khoảng 120 BU hoặc cao hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 150 BU hoặc cao hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không được cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 300 BU hoặc thấp hơn, khoảng 290 BU hoặc thấp hơn, khoảng 280 BU hoặc thấp hơn, 200 BU hoặc thấp hơn, khoảng 190 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 180 BU hoặc thấp hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không được cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 300 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 320 BU hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 330 BU hoặc cao hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 350 BU hoặc cao hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không được cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng độ nhớt phân hủy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 550 BU hoặc thấp hơn, khoảng 540 BU hoặc thấp hơn, khoảng 530 BU hoặc thấp hơn, khoảng 500 BU hoặc thấp hơn, khoảng 480 BU hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 470 BU hoặc thấp hơn.

### 3.2 Khả năng tạo gel



Đã biết rằng khi hàm lượng tinh bột của hồ tinh bột đạt đến nồng độ định trước hoặc lớn hơn, gel tinh bột được tạo thành bằng cách làm nguội nó. Tương tự với độ nhớt, tính chất vật lý của gel tinh bột này thay đổi phụ thuộc vào nguồn gốc và phương pháp sản xuất tinh bột, và tinh bột được sử dụng trong nhiều thực phẩm khác nhau tính đến các đặc điểm của tính chất vật lý tạo gel này. Một số phương pháp xác định tính chất vật lý của gel được sử dụng trên thực tế, và một trong số các phương pháp này là phương pháp xác định bằng cách sử dụng lưu biến kế. Khả năng tạo gel có thể được xác định bằng phương pháp sau bằng cách sử dụng lưu biến kế. Ví dụ, hồ tinh bột được đổ vào trong hộp, được gia nhiệt, và sau đó được làm lạnh trong 16 giờ hoặc 21 ngày (ví dụ, ở nhiệt độ khoảng 5°C) và, sau khi quay trở lại nhiệt độ trong phòng (ví dụ, ở nhiệt độ khoảng 25°C), tính chất vật lý của gel được xác định bởi lưu biến kế.

Phương pháp xác định bằng cách sử dụng lưu biến kế chuyên dụng là như được nêu trong phần 1.2.2 nêu trên. Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột lúa mì chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tốt hơn nếu tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym có ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý, hoặc có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (nằm trong khoảng từ 110% đến 330% theo một phương án) môđun Young của tinh bột lúa mì chưa qua xử lý.

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột ngô chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tốt hơn nếu tinh bột ngô đã xử lý bằng enzym có ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột ngô chưa



qua xử lý, hoặc có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (330% hoặc thấp hơn theo một phương án) môđun Young của tinh bột ngô chưa qua xử lý.

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột sắn chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tốt hơn nếu tinh bột sắn đã xử lý bằng enzym có ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 110% đến 300% ứng suất gãy của tinh bột sắn chưa qua xử lý, hoặc có môđun Young nằm trong khoảng từ 110% đến 500% (330% hoặc thấp hơn theo một phương án) môđun Young tinh bột sắn chưa qua xử lý.

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột lúa mì chưa qua xử lý và không trải qua cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, và tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì, thì ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 150 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 160 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 170 g hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 180 g hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 200 g hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 450 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 440 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 430 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 420 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 410 g hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 400 g hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 210 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 220 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 230 g hoặc lớn

hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 240 g hoặc lớn hơn, và, theo một phương án, là 250 g hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 450 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 440 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 430 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 420 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 410 g hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 400 g hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng 55 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 60 g hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 65 g hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng 70 g hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng ứng suất gãy của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng 150 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 140 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 130 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 120 g hoặc nhỏ hơn, khoảng 110 g hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 100 g hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng  $5,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $5,2 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $5,4 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng  $5,6 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột

lúa mì và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng  $8,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $7,5 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $7,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $6,9 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $6,8 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng  $6,7 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng  $6,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $6,2 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $6,3 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng  $6,5 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng  $9,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $8,9 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $8,8 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $8,7 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $8,6 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng  $8,5 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được tốt hơn nếu là khoảng  $5,2 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $5,4 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng  $5,6 \times 10^5$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là khoảng  $5,8 \times 10^5$

dyn/cm<sup>2</sup> hoặc lớn hơn. Trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì mặc dù không có giới hạn trên cụ thể của môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được, nhưng môđun Young của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có thể là, ví dụ, khoảng  $2,7 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $2,5 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $2,4 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $2,3 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $2,2 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $2,0 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,8 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,6 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,5 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,4 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,3 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, khoảng  $1,2 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng  $1,1 \times 10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> hoặc nhỏ hơn.

Theo phương án cụ thể, trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột lúa mì và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có sự phân hủy (khoảng 100 BU hoặc cao hơn), và ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 150 đến 450 (g) hoặc môđun Young nằm trong khoảng từ 5.000.000 đến 8.000.000 (dyn/cm<sup>2</sup>).

Theo phương án cụ thể, trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột ngô và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được có sự phân hủy (khoảng 100 BU hoặc cao hơn), và ứng suất gãy nằm trong khoảng từ 210 đến 450 (g) (nằm trong khoảng từ 220 đến 450 (g) theo một phương án) hoặc môđun Young nằm trong khoảng từ 6.000.000 đến 9.000.000 (dyn/cm<sup>2</sup>).

Theo phương án cụ thể, trong trường hợp tinh bột chưa qua xử lý là tinh bột sắn và không thực hiện cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý, thì tinh bột đã

xử lý bằng enzym thu được có sự phân hủy (khoảng 100 BU hoặc cao hơn), và ứng suất gãy bằng khoảng 55 đến khoảng 150 (g) hoặc môđun Young bằng khoảng 520.000 đến khoảng 2.700.000 (dyn/cm<sup>2</sup>) (khoảng 520.000 đến khoảng 1.600.000 (dyn/cm<sup>2</sup>) theo một phương án).

Ngoài ra, trong trường hợp tinh bột được cải biến hóa học hoặc tinh bột đã xử lý vật lý được sử dụng làm các hạt tinh bột, hoặc trong trường hợp cải biến hóa học hoặc xử lý vật lý được thực hiện sau khi xử lý enzym, thì sự cải thiện khả năng tạo gel có thể thu được tương tự như nêu trên.

3.3 Tinh bột đã xử lý bằng enzym trong đó các nhóm hydroxyl ở vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza không được cải biến

Trong trường hợp các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được tạo ra từ tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được tẩy trắng và không trải qua cải biến hóa học, vì tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế không trải qua xử lý hóa học nhân tạo, nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza không được cải biến so với tinh bột tự nhiên (tức là, tinh bột chưa qua xử lý). Tinh bột, trong đó nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza được cải biến, chỉ tinh bột được cải biến (còn được gọi là tinh bột được cải biến hóa học) được cho qua quá trình được gọi là sự cải biến hóa học bởi quy trình công nghiệp. Theo sắc lệnh của bộ trưởng về việc sửa đổi một phần của Sắc lệnh thực hiện luật vệ sinh an toàn thực phẩm được thông báo trong thông báo số 485 ngày 01 tháng 10 năm 2008 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội, 11 điểm sau về tinh bột được cải biến sẽ được xếp vào chất phụ gia:

-tinh bột kép adipat axetyl hóa;

- tinh bột oxy hóa axetyl hóa;
- tinh bột kép phosphat axetyl hóa;
- tinh bột natri octenyl suxinat;
- tinh bột axetat;
- tinh bột oxy hóa;
- tinh bột kép hydroxypropyl phosphat;
- tinh bột hydroxypropyl ;
- tinh bột kép phosphat;
- tinh bột đơn phosphat; và
- tinh bột kép phosphat phosphat hóa.

Trong thông báo số 485 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội, phương pháp kiểm tra độ tinh khiết của các tinh bột này được mô tả. Do vậy, có thể đánh giá rằng mẫu tinh bột không phải là tinh bột được cải biến hóa học, ví dụ, bằng cách phân tích các chất hóa học khác nhau trong mẫu tinh bột, như nhóm axit adipic, nhóm axetyl và nhóm carboxyl theo phương pháp kiểm tra độ tinh khiết của nhiều tinh bột được cải biến khác nhau nêu trên được mô tả trong thông báo số 485 ngày 01 tháng 10 năm 2008 của Bộ y tế và phúc lợi xã hội, so sánh với kết quả phân tích của nguyên liệu thô tinh bột tự nhiên được tiến hành để làm tham chiếu cho phép so sánh, và xác nhận không có sự tăng hàm lượng của các chất hóa học khác nhau tương ứng. Đặc biệt là, có thể đánh giá rằng mẫu tinh bột không phải là tinh bột được cải biến hóa học, bằng cách xác định hàm lượng của nhóm axit adipic, hàm lượng của nhóm axetyl, hàm lượng của nhóm carboxyl, hàm lượng của vinyl axetat, hàm lượng của nhóm axit octenyl



suxinic, hàm lượng của nhóm hydroxypropyl và hàm lượng của propylen clohydrin, và xác nhận rằng hàm lượng của chúng không tăng so với hàm lượng của chúng trong nguyên liệu thô tinh bột tự nhiên. Tốt hơn nếu sử dụng hàm lượng của nhóm axit adipic, hàm lượng của nhóm axetyl, hàm lượng của nhóm carboxyl, hàm lượng của nhóm axit octenyl suxinic, hàm lượng của nhóm hydroxypropyl và hàm lượng của propylen clohydrin làm tiêu chuẩn đánh giá. Đã nhận thấy rằng tinh bột được tẩy trắng được xử lý tẩy trắng bằng cách sử dụng natri hypoclorit được phân phối như thực phẩm. Cũng có thể đánh giá tinh bột được tẩy trắng này bằng cách xác định hàm lượng của nhóm carboxyl bằng cách sử dụng phương pháp kiểm tra độ tinh khiết tương tự với phương pháp kiểm tra đối với tinh bột oxy hóa nêu trên. Tinh bột được cải biến hóa học khác với tinh bột được cải biến nêu trên trong 11 điểm không thể được sử dụng trong thực phẩm vì nó không được công nhận bởi Luật vệ sinh an toàn thực phẩm của Nhật Bản. Do vậy, tinh bột được cải biến hóa học khác với 11 điểm nêu trên về cơ bản không được sử dụng ở Nhật Bản và không được phân phối. Do đó, trên thực tế, trong trường hợp xác định được nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của gốc glucoza của tinh bột theo sáng chế có được cải biến hay không, không cần thiết phải xác định xem sự cải biến hóa học khác với sự cải biến hóa học nêu trên có được thực hiện hay không.

Trong bản mô tả này, trong trường hợp “nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza không được cải biến”, tốt hơn nếu tất cả các nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza không được cải biến. Tuy nhiên, trong trường hợp nhóm hydroxyl được thực hiện một số cải biến ở trạng thái tự nhiên, một số cải biến có thể được bao gồm. Trong trường hợp này, dựa trên tổng số lượng nhóm hydroxyl ở các vị trí 2, 3 và 6 của các gốc glucoza, tốt

hơn nếu là khoảng 70% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa nếu khoảng 80% hoặc cao hơn, vẫn tốt hơn nữa nếu khoảng 90% hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 95% hoặc cao hơn, khoảng 96% hoặc cao hơn, khoảng 97% hoặc cao hơn, khoảng 98% hoặc cao hơn, khoảng 99% hoặc cao hơn, hoặc khoảng 99,5%, và tốt nhất nếu là khoảng 100% nhóm hydroxyl không được cải biến.

#### 4. Thực phẩm theo sáng chế

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm bước xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym; trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp; gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và làm nguội hỗn hợp chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa nhờ đó gel hóa tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột.

Theo phương án cụ thể khác, thực phẩm theo sáng chế là thực phẩm chứa tinh bột được nấu chín bằng nhiệt chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym có độ nhớt và khả năng tạo gel cao. Theo phương án cụ thể khác, thực phẩm chứa tinh bột theo sáng chế là thực phẩm được sản xuất bằng phương pháp bao gồm bước trộn nguyên liệu thực phẩm với tinh bột đã xử lý bằng enzym, và sau đó gia nhiệt hỗn hợp này.

Trong bản mô tả này, thực phẩm chứa gel tinh bột được dùng để chỉ thực phẩm chứa gel tinh bột. Nếu thực phẩm chứa gel tinh bột thì thực phẩm này không cần thiết phải hoàn toàn ở dạng gel. Ví dụ, trong trường hợp thực phẩm chứa gelatin như bánh putđinh sữa trứng; và bánh kẹo kiểu Nhật truyền

thống giống như gel như bánh tinh bột sắn dây và Uiro, thì toàn bộ thực phẩm tạo gel. Trong trường hợp thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu như kem tươi và kem; và nước xốt như nước xốt thịt, thực phẩm không hoàn toàn ở dạng gel mà chứa gel tinh bột micro, và do vậy được bao gồm trong thực phẩm chứa gel tinh bột theo sáng chế. Ngoài ra, bánh mì và bánh kẹo kiểu phương Tây được bao gồm trong thực phẩm chứa gel tinh bột theo sáng chế vì chúng chứa gel tinh bột với hàm lượng nước giảm mà thu được bằng cách tạo gel ngay trong quá trình sản xuất, và nướng gel này.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym. Tinh bột được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong các ứng dụng như trong tinh bột thông thường. Bằng cách sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế trong thực phẩm, tính chất vật lý và kết cấu của thực phẩm được thay đổi. Tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể được sử dụng trong hầu như tất cả các chế phẩm để ăn và uống hoặc chế phẩm cho các chất phụ gia thực phẩm được tạo ra bằng cách sử dụng tinh bột thông thường. Trong thực phẩm theo sáng chế, có thể sử dụng nguyên liệu bất kỳ thường được sử dụng trong chế phẩm và thực phẩm mục tiêu với điều kiện không làm giảm tác dụng tuyệt vời thu được bởi các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym. Theo phương án được ưu tiên, tinh bột theo sáng chế tạo gel trong thực phẩm theo sáng chế.

Trong trường hợp tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được sử dụng trong thực phẩm có hàm ẩm cao, thì nó tạo thành khối, tạo độ dẻo tự nhiên nhờ khả năng tạo gel mạnh, và còn tạo kết cấu trơn mịn thích hợp trong miệng. Thực phẩm có hàm ẩm cao dùng để chỉ thực phẩm trong đó lượng hơi

ẩm cho mỗi 100 g khẩu phần ăn là lớn hơn 40 g ở trạng thái khi ăn. Ví dụ về thực phẩm có hàm ẩm cao bao gồm, ví dụ, bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước xốt cay và nước xốt, và mì sợi.

Trong trường hợp tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế được sử dụng trong thực phẩm có hàm ẩm thấp, có thể tạo kết cấu trơn mịn với khả năng tan tốt trong miệng. Thực phẩm có hàm ẩm thấp dùng để chỉ thực phẩm trong đó lượng hơi ẩm cho mỗi 100 g khẩu phần ăn là 40 g hoặc ít hơn ở trạng thái khi ăn. Ví dụ về thực phẩm có hàm ẩm thấp bao gồm, ví dụ, bánh mì, bánh kẹo kiểu phương Tây, thực phẩm chiên rán, và kẹo thạch.

Như nêu trên, thực phẩm có hàm ẩm cao và thực phẩm có hàm ẩm thấp được phân loại theo lượng hơi ẩm, cho mỗi 100 g khẩu phần ăn, mà tương ứng lớn hơn 40 g, hoặc 40 g hoặc ít hơn. Với điều kiện thực phẩm trong đó lượng hơi ẩm cho mỗi 100 g khẩu phần ăn là khoảng 40 g (nằm trong khoảng từ 35 đến 50 g) đôi khi có thể thể hiện các tính chất vật lý trái ngược phụ thuộc vào dạng, ngay cả trong trường hợp cùng lượng hơi ẩm. Ngoài ra, trong trường hợp thực phẩm chiên rán, nó được đánh giá bởi lượng hơi ẩm đối với phần phủ trong đó nguyên liệu thực phẩm lõi đã được loại bỏ.

Lượng nước cho mỗi 100 g khẩu phần ăn của nhiều thực phẩm khác nhau được nêu làm ví dụ dưới đây (trích từ bảng thành phần thực phẩm chuẩn ở Nhật Bản (Tái bản có sửa chữa và bổ sung lần thứ 5); con số trong dấu ngoặc đơn biểu thị lượng hơi ẩm):

(1) Bánh mì: bánh mì trắng thường (38,0 g), bánh quy cứng (2,6 g), bánh ngọt nướng (32,0 g), Eisei-boro (4,5 g);

(2) Bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống: Uiro (54,5 g), Kudzu-manju (45,0 g), Daifuku-mochi (41,5 g);

(3) Bánh kẹo kiểu phương Tây: bánh xốp (32,0 g), Kasutera (25,6 g), bánh kép (40,0 g);

(4) Thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu: kem tươi (loại chất béo sữa, 42,1 g), kem tươi (loại chất béo thực vật, 41,2 g), kem (sữa lạnh: 65,6 g, kem lactic: 60,4 g);

(5) Thực phẩm chứa gelatin: bánh putđinh sữa trứng (74,1 g);

(6) Thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật: Sumaki-bánh cá của Nhật (kamaboko) (75,8 g), Yakinuki-bánh cá của Nhật (kamaboko) (72,8 g), xúc xích Vienna (53,0 g);

(7) Nước sốt cay và nước sốt: nước sốt worcester (61,7 g), nước sốt thịt (78,8 g), nước sốt xa-lát Thousand island (44,1 g); và

(8) Kẹo thạch: kẹo thạch (16 g), kẹo gồm hạt đậu (jelly beans) (9,5 g).

Bằng cách sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế trong các thực phẩm này, các tính chất vật lý sau, ví dụ, được cải thiện so với trường hợp sử dụng tinh bột thông thường:

(1) Trong bánh mì, kết cấu với độ mềm và khả năng tan tốt trong miệng được tạo ra. Ví dụ về bánh mì gồm bánh mì, bánh quy, bánh quy mặn, vỏ bánh pizza, bánh ngọt nướng, cốc ngô cho kem, bánh ngọt của Monaka, và phần xốp của bánh xốp kem.

(2) Trong bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, độ cứng thích hợp, độ giòn, và độ nhót đàn hồi thích hợp và kết cấu dính được tạo ra. Ví dụ về bánh kẹo

kiểu Nhật truyền thống gồm bánh tinh bột sắn dây, Uiro, và Manju.

(3) Trong bánh kẹo kiểu phương Tây, sự cải thiện thể tích bởi sự phồng tốt sau khi nướng cũng như kết cấu mềm và đẹp được tạo ra. Ví dụ về bánh kẹo kiểu phương Tây bao gồm bánh xốp, bánh chiffon, Kasutera, Madeleine, bánh tráng miệng có nguồn gốc từ Pháp (financier), bánh bông lan, và bánh cuộn Thụy Sĩ.

(4) Trong thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, trong khi vẫn giữ nguyên hình dạng và hình khối thích hợp, khả năng tan tốt trong miệng và kết cấu trơn mịn được tạo ra. Ví dụ về thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu bao gồm kem sữa trứng, bột mì nhão, món thịt nhồi, kem tươi, và kem (ví dụ, sữa lạnh, kem lactic).

(5) Trong thực phẩm chứa gelatin, trong khi vẫn giữ nguyên độ dính và khả năng nhai, khả năng tan tốt trong miệng và kết cấu trơn mịn được tạo ra. Ví dụ về thực phẩm chứa gelatin bao gồm thạch, bánh putđinh, bánh mousse, sữa chua, và đậu phụ vùng (goma-dofu).

(6) Trong thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, trong khi có độ dẻo với khả năng nhai tốt, có thể tạo ra hiệu quả ít thay đổi theo thời gian. Ví dụ về thực phẩm thịt cá và thịt đã qua chế biến bao gồm bánh cá của Nhật (kamaboko) và xúc xích.

(7) Trong nước xốt cay và nước xốt, trong khi duy trì được hình dạng và hình khối tốt, các tính chất ít gây ra sự nhỏ giọt hơn vì sự kết dính tốt bên trên thực phẩm cũng như cảm giác tạo thành sợi và độ dính ít hơn, và kết cấu trơn mịn được tạo ra. Ví dụ về nước xốt cay và nước xốt bao gồm nước xốt cay cho cá đã được cắt và nướng, lớp tráng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango),



nước xốt trái cây, nước xốt màu trắng, và nước xốt (dressing).

(8) Trong thực phẩm chiên rán, kết cấu giòn nhẹ được tạo ra. Ví dụ về thực phẩm chiên rán bao gồm món Tempura và tôm chiên.

(9) Trong mì sợi, kết cấu dính giàu khả năng nhai được tạo ra. Ví dụ về mì sợi bao gồm udon, somen, hiyamugi, mì sợi Trung Quốc, mì sợi kiểu mạch, macaroni, và spaghetti.

(10) Trong kẹo thạch, trong khi có độ dẻo thích hợp, khả năng tan tốt trong miệng và kết cấu trơn mịn được tạo ra. Ví dụ về kẹo thạch gồm kẹo thạch và kẹo gồm hạt đậu (jelly beans).

Trong thực phẩm theo sáng chế, tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể được sử dụng với lượng giống như lượng tinh bột thường được sử dụng trong thực phẩm. Tinh bột thông thường có thể được sử dụng một phần và phần còn lại có thể được thay thế bằng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế. Tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế tốt hơn nếu chiếm khoảng 50% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 60% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 70% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu là khoảng 80% khối lượng hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nếu là khoảng 90% khối lượng hoặc lớn hơn, và tốt nhất nếu là 100% khối lượng, của lượng tinh bột thường được sử dụng. Nói cách khác, tốt nhất nếu toàn bộ lượng tinh bột thông thường được thay thế bằng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế.

##### 5. Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột

Theo phương án cụ thể, phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột theo sáng chế bao gồm bước xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ

nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym; trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp; gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và làm nguội hỗn hợp chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa nhờ đó gel hóa tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột. Trong quá trình sản xuất thực phẩm thông thường, các hạt tinh bột không được xử lý bằng enzym trong quá trình sản xuất thực phẩm.

Bước xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C để thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể được tiến hành như được nêu chi tiết trong phần “2.2 Phản ứng Enzym” nêu trên. Như nêu trên, các hạt tinh bột có thể là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học. Trong trường hợp ưu tiên thu được tinh bột đã xử lý bằng enzym mà được phân loại là thực phẩm, thì các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được tẩy trắng, và các hạt tinh bột không được cải biến hóa học ở giai đoạn bất kỳ cho đến khi thực phẩm chứa gel tinh bột thu được bằng cách sử dụng các hạt tinh bột này. Theo phương án cụ thể, hạt tinh bột là hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột đã xử lý vật lý, bước cải biến hóa học tinh bột đã xử lý bằng enzym cũng được bao gồm, và tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được cải biến hóa học được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước. Theo phương án cụ thể khác, các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, bước xử lý vật lý tinh bột đã xử lý bằng enzym cũng được bao gồm, và tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được xử lý vật lý được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.

Tiếp theo, hỗn hợp thu được bằng cách trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh

bột đã xử lý bằng enzym và nước. Phương pháp trộn và tỷ lệ trộn nguyên liệu thực phẩm, tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước có thể là phương pháp trộn và tỷ lệ trộn theo phương pháp thông thường để sản xuất thực phẩm mục tiêu.

Tiếp theo, hỗn hợp được gia nhiệt nhờ đó gelatin hóa tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp. Việc gia nhiệt có thể là nấu bằng nhiệt. Việc gia nhiệt có thể được tiến hành trong cùng điều kiện như điều kiện của phương pháp nấu bằng nhiệt trong phương pháp thông thường để sản xuất thực phẩm mục tiêu.

Tiếp theo, hỗn hợp chứa tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa được làm nguội, nhờ đó gel hóa tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột. Có thể tiến hành làm nguội bằng cách để hỗn hợp sau khi gia nhiệt ở nhiệt độ trong phòng, hoặc được tiến hành trong tủ lạnh hoặc các thiết bị tương tự.

Trong phương án trong đó sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế, thực phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra theo phương pháp giống như trong trường hợp tinh bột thông thường, ngoại trừ rằng tinh bột đã xử lý bằng enzym được sử dụng. Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa tinh bột theo sáng chế bao gồm bước bổ sung tinh bột đã xử lý bằng enzym vào nguyên liệu thực phẩm và trộn chúng; và nấu bằng nhiệt hỗn hợp này.

Tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có độ nhớt và khả năng tạo gel tuyệt vời so với tinh bột thông thường chưa qua xử lý. Do vậy, bằng cách bổ sung tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế vào nguyên liệu thực phẩm, trộn chúng và nấu bằng nhiệt hỗn hợp này, tinh bột đã xử lý bằng enzym này được gelatin hóa và sau đó được làm nguội để tạo gel. Do đó, nguyên liệu được

nấu bằng nhiệt thu được có các tính chất vật lý tuyệt vời (ví dụ, hình dạng tuyệt vời, độ dẻo tự nhiên, khả năng tan tốt trong miệng, kết cấu trơn mịn, kết cấu dính, và kết cấu mềm) so với nguyên liệu được nấu bằng nhiệt sử dụng tinh bột thông thường chưa qua xử lý. Trong bản mô tả này, thực phẩm cũng có thể là đồ uống.

Trong bản mô tả này, “nấu bằng nhiệt” được dùng để chỉ sự gia nhiệt hỗn hợp của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột. Tốt hơn nếu nấu bằng nhiệt có thể là sự gia nhiệt ở nhiệt độ phân hủy các hạt tinh bột hoặc cao hơn. Ví dụ, hỗn hợp của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột có thể được gia nhiệt ở nhiệt độ khoảng 70°C hoặc cao hơn, khoảng 80°C hoặc cao hơn, khoảng 90°C hoặc cao hơn hoặc khoảng 95°C hoặc cao hơn. Tốt hơn nếu nấu bằng nhiệt được thực hiện ở nhiệt độ mà tại đó không xảy ra sự biến tính quá mức của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột. Ví dụ, hỗn hợp của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột có thể được gia nhiệt ở khoảng 200°C hoặc thấp hơn, khoảng 150°C hoặc thấp hơn, khoảng 130°C hoặc thấp hơn hoặc khoảng 110°C hoặc thấp hơn. Việc nấu bằng nhiệt được thực hiện trong thời gian nấu bằng nhiệt thông thường đối với thực phẩm mục tiêu.

Việc nấu bằng nhiệt tốt hơn nếu được tiến hành trong điều kiện có độ ẩm nhất định. Thông thường, khi các hạt tinh bột được gia nhiệt trong điều kiện có lượng nước định trước hoặc lớn hơn, sự trương nở xuất hiện, độ trong suốt tăng và độ nhớt tăng. Khi nguyên liệu thực phẩm chứa quá nhiều hơi ẩm, không cần thiết bổ sung nước vào hỗn hợp của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột. Tuy nhiên, khi nguyên liệu thực phẩm chứa lượng hơi ẩm nhỏ, tốt hơn nếu bổ sung nước vào hỗn hợp của nguyên liệu thực phẩm và tinh bột. Lưu ý rằng trong trường hợp thực phẩm không chứa nguyên liệu thực phẩm khác với nước

và tinh bột, như kuzuyu không chứa đường, thì nước được xem là nguyên liệu thực phẩm.

Việc nấu bằng nhiệt có thể là một phần của phương pháp sản xuất thực phẩm mục tiêu. Ví dụ, trong trường hợp thực phẩm chứa gelatin như thạch, nó có thể được làm nguội nhiệt sau khi nấu ở nhiệt độ, ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 10°C.

#### 6. Giải thích trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*;

SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin của  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*;

SEQ ID NO: 3 là trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 4 là trình tự axit amin của  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 5 là trình tự nucleotit mã hóa amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 6 là trình tự axit amin của amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 7 là trình tự nucleotit mã hóa isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.*;

SEQ ID NO: 8 là trình tự axit amin của isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.*;

SEQ ID NO: 9 là trình tự nucleotit mã hóa isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*;

SEQ ID NO: 10 là trình tự axit amin của isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*;

SEQ ID NO: 11 là trình tự nucleotit mã hóa  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 12 là trình tự axit amin của  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*;

SEQ ID NO: 13 là trình tự nucleotit mã hóa xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Paenibacillus macerans* (còn được phân loại là *Bacillus macerans*).

SEQ ID NO: 14 là trình tự axit amin của xyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Paenibacillus macerans* (còn được phân loại là *Bacillus macerans*).

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Tiếp theo, sáng chế sẽ được bộc lộ chi tiết hơn bằng các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Lưu ý rằng trong phần Ví dụ này, độ nhớt được xác định bằng phương pháp amylograph của Brabender Inc., và tính chất vật lý của gel được xác định bằng lưu biến kế của Rheotech Inc.

#### **1. Phương pháp xác định độ nhớt**

Độ nhớt được xác định bằng phương pháp sau. Huyền phù tinh bột được điều chỉnh trong 450 ml nước sao cho hàm lượng tinh bột lúa mì là 8,5% khối lượng, hàm lượng tinh bột ngô là 7,0% khối lượng và hàm lượng tinh bột sắn là 6,0% khối lượng, tính theo chất khô và, được đặt trong đồ chứa mẫu, và sau đó



được làm ấm đến nhiệt độ 50°C trong khi quay chúng. Sau đó, huyền phù được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C ở tốc độ 1,5°C/phút, và được giữ ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút, sau đó là làm nguội ở tốc độ 1,5°C/phút. Việc xác định được tiến hành bằng cách sử dụng amylograph VISCOGRAPH-E do Brabender Inc. sản xuất trong điều kiện số vòng quay của đồ chứa mẫu là 75 vòng/phút và hộp xác định là 700 cmg. Trong đó, độ nhớt đạt đến đỉnh được đánh giá là độ nhớt tối đa, và độ chênh lệch giữa độ nhớt tối đa và độ nhớt ngay sau khi duy trì ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút được đánh giá là sự phân hủy.

## 2. Phương pháp xác định tính chất vật lý của gel

Tính chất vật lý của gel được xác định bằng phương pháp sau. Hồ tinh bột được điều chế sao cho hàm lượng tinh bột là 20% khối lượng tính theo chất khô, và sau đó được đổ vào hộp Krehalon có độ dày cuộn gấp là 45 mm. Sau khi đổ vào hộp này, hồ tinh bột được gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C ở tốc độ 1°C/phút và được giữ ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút. Sau đó, hồ tinh bột được để nguội trong bể nước có nhiệt độ không đổi ở nhiệt độ 20°C trong 30 phút và sau đó được làm lạnh xuống 5°C trong tủ lạnh. Sau khi làm lạnh, nó được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 5°C trong 16 giờ, sau đó nó được để ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) trong 4 giờ để nhiệt độ của nó quay trở lại nhiệt độ trong phòng, và sau đó tính chất vật lý của gel được xác định bằng lưu biến kế (RT-2010J-CW) do Rheotech Inc sản xuất. Việc xác định được tiến hành trong điều kiện xác định của lưu biến kế: mục thử nghiệm: thử nghiệm kéo đứt; chiều cao của mẫu: 25 mm; và tốc độ chuyển động (tốc độ gãy) của mẫu: 6 cm/phút, sử dụng bộ thích ứng của gá hình cầu để xác định độ nhớt  $\phi 5$  (đường kính: 5 mm, diện tích: 19,635 mm<sup>2</sup>). Tại thời điểm xác định, độ cứng của gel tinh bột được đánh giá bởi ứng suất gãy (g) và mô đun Young (dyn/cm<sup>2</sup>).

### 3. Phương pháp xác định tỷ lệ phân giải của các hạt tinh bột

Tỷ lệ phân giải của các hạt tinh bột được xác định bằng phương pháp sau. Lượng (g) đường khử được giải phóng chứa trong phần dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút) của huyền phù tinh bột được phân hủy sau khi thực hiện phản ứng enzym được xác định bằng phương pháp phenol-axit sulfuric. Tỷ lệ phần trăm của lượng đường khử được giải phóng so với tổng lượng tinh bột (g) trước khi thực hiện phản ứng enzym được xác định.

Phương trình 1:

Tỷ lệ phân giải (%) của các hạt tinh bột =  $\{(\text{lượng (g) đường khử được giải phóng}) \times 100\} / \{(\text{tổng lượng (g) tinh bột trước phản ứng enzym})\}$

Ví dụ thử nghiệm 1: So sánh giữa phản ứng chất lỏng và phản ứng chất rắn

#### 1. Phản ứng chất lỏng

250 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 15 g (khối lượng khô) tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý và, sau khi điều chỉnh độ pH của hỗn hợp đến 5,0, hỗn hợp được làm ấm trong bể nước sôi để điều chế hồ tinh bột trong đó tinh bột được hòa tan hoàn toàn. 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*) được bổ sung vào hồ tinh bột này, để làm cho khối lượng tổng cộng đạt 300 g, và được khuấy ở nhiệt độ 50°C để tiến hành phản ứng enzym. Sau 30 phút, hỗn hợp này được để trong bể nước sôi trong 10 phút để khử hoạt tính enzym và bằng cách đó thu được mẫu 1. Bằng cách sử dụng mẫu 1 thu được, tiến hành xác định và đánh giá tính chất vật lý của gel thông qua ứng suất gãy và mô đun Young.

## 2. Phản ứng chất rắn

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý (khối lượng khô), để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (Nguồn gốc: *Aspergillus oryzae*) được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Nước trao đổi ion được bổ sung vào 15 g (khối lượng khô) tinh bột đã xử lý bằng enzym này để làm cho khối lượng tổng cộng đạt 300 g. Hỗn hợp này được làm ấm trong bể nước sôi để điều chế hồ tinh bột trong đó tinh bột được hòa tan hoàn toàn, bằng cách đó thu được mẫu 2. Bằng cách sử dụng mẫu 2 thu được, tính chất vật lý của gel được xác định và được đánh giá bởi ứng suất gãy và môđun Young.

Bảng 1

| Tính chất vật lý của gel | Mẫu 1<br>(được phản ứng ở dạng chất lỏng)                 | Mẫu 2<br>(được phản ứng ở dạng chất rắn) | Tinh bột lúa mì chưa qua xử lý |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| Ứng suất gãy             | Không thể xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm | 206 g                                    | 141 g                          |
| Môđun Young              |                                                           | 5.533.540 dyn/cm <sup>2</sup>            | 4.601.665 dyn/cm <sup>2</sup>  |

Khi enzym được để tác động lên tinh bột sau khi gel hóa, xác nhận thấy sự giảm độ nhớt đáng kể trong mẫu 1 thu được, và mẫu này không còn giữ được tính chất vật lý độ nhớt của tinh bột nữa và do đó, gel không được tạo thành. Mặt khác, khi enzym được phản ứng giữ cho các hạt tinh bột nguyên vẹn, đã xác nhận rằng mẫu 2 thu được giữ được tính chất vật lý độ nhớt của tinh bột và gel cứng được tạo thành.

## Ví dụ so sánh 1

Các đặc tính độ nhớt được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế mà không tiến hành xử lý enzym đối với tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

## Các ví dụ 1-1 và 1-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“Biozyme A” thu được từ *Aspergillus oryzae*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ để thực hiện phản ứng enzym và tạo ra chế phẩm mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 5% (Ví dụ 1-1). Bằng cách sử dụng lượng enzym tương tự, tiến hành khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 3 giờ để điều chế mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 10% (Ví dụ 1-2). Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

## Ví dụ 1-3

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“Biozyme A” thu được từ *Aspergillus oryzae*, do Amano

Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 2A

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 2B

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“Sumizyme AS” thu được từ *Aspergillus niger*, do SHIN

NIHON CHEMICALS Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

Các ví dụ so sánh 2, 3, 4-3, 5 và 6

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“ $\alpha$ -amylaza 3A” thu được từ *Bacillus subtilis*, do HBI, Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,9; Ví dụ so sánh 2),  $\alpha$ -amylaza (“Novamyl” thu được từ *Bacillus subtilis*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0; Ví dụ so sánh 3),  $\alpha$ -amylaza (“ $\alpha$ -amylaza” thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0; Ví dụ so sánh 4-3),  $\alpha$ -amylaza (“TERMAMYL 120L” thu được từ *Bacillus licheniformis*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0; Ví dụ so sánh 5), hoặc  $\alpha$ -amylaza (“Maltogenase L” thu được từ *Bacillus sp.*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0; Ví dụ so sánh 6) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong



Bảng 2-2.

Các ví dụ so sánh 4-1 và 4-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,01% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“ $\alpha$ -amylaza” thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 30 phút để điều chế mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 5%. Ngoài ra, bằng cách sử dụng lượng enzym tương tự, tiến hành khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 1,5 giờ để điều chế mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 10%. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

Các ví dụ 3A-1 và 3A-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“AMG” thu được từ *Aspergillus niger*, do Novozymes sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 2 giờ để điều chế mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 5% (Ví dụ 3A-1). Ngoài ra, 0,5% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) enzym tương tự được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 3 giờ để điều chế mẫu có tỷ lệ phân giải khoảng 10% (Ví dụ 3A-2). Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột

đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

#### Ví dụ 3A-3

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“AMG” thu được từ *Aspergillus niger*, do Novozymes sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 3B

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích

bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 3C

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“DIAZYME X4NP” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 3D

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“glucoamylaza 'Amano' SD” thu được từ *Aspergillus niger*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý

bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 3E

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“Gluczyme AF6” thu được từ *Rhizopus niveus*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 3F

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“Sumizyme” thu được từ *Rhizopus oryzae*, do SHIN NIHON CHEMICALS Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý

bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ so sánh 8

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Candida tsukubaensis*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 2,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 4

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) isoamylaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 3,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý

bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 5A

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -glucosidaza (“Transglucosidase L 'Amano” thu được từ *Aspergillus niger*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 5B

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -glucosidaza (“Transglucosidase L-500” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được



phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Các ví dụ so sánh từ 10 đến 11

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\beta$ -amylaza (“OPTIMALT BBA” thu được từ lúa mạch, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) hoặc pullulanaza (“Pullulanase” thu được từ *Klebsiella pneumoniae*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ so sánh 12

Các đặc tính độ nhớt được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế mà không cho tinh bột ngô qua sự xử lý enzym. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

#### Ví dụ 6

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của

tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“Biozyme A” thu được từ *Aspergillus oryzae*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

#### Các ví dụ so sánh 13-1 và 13-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,01% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ so sánh 13-1)  $\alpha$ -amylaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 30 phút, hoặc 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ so sánh 13-2)  $\alpha$ -amylaza được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ, để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

#### Các ví dụ 7-1 và 7-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,5% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ 7-1) amyloglucosidaza (“AMG” thu được từ *Aspergillus niger*, do Novozymes sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 3 giờ, hoặc 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ 7-2) amyloglucosidaza được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ, để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

#### Ví dụ so sánh 14

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\beta$ -amylaza (“OPTIMALT BBA” thu được từ lúa mạch, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

## Ví dụ 8A

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) isoamylaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 3,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

## Ví dụ 8B

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

## Ví dụ 8C

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -glucosidaza (“Transglucosidase L 'Amano” thu được từ *Aspergillus niger*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2.

## Ví dụ so sánh 15

Các đặc tính độ nhớt được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế mà không thực hiện xử lý enzym đối với tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

## Ví dụ 9

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“Biozyme A” thu được từ *Aspergillus oryzae*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi.

Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

Các ví dụ so sánh 16-1 và 16-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sẵn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,01% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ so sánh 16-1)  $\alpha$ -amylaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 30 phút, hoặc 1,0% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ so sánh 16-2)  $\alpha$ -amylaza được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ, để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

Các ví dụ 10-1 và 10-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sẵn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,5% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ 10-1) amyloglucosidaza (“AMG” thu được từ *Aspergillus*



*niger*, do Novozymes sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,5) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 3 giờ, hoặc 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) (Ví dụ 10-2) amyloglucosidaza được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ, để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

#### Ví dụ so sánh 17

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\beta$ -amylaza (“OPTIMALT BBA” thu được từ lúa mạch, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

#### Ví dụ 11A

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của

huyền phù đến 5,0, bổ sung 0,1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) isoamylaza (“Chất phản ứng” thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*, do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất; độ pH tối ưu bằng 3,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

#### Ví dụ 11B

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

#### Ví dụ 11C

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để tạo ra huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của

huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -glucosidaza (“Transglucosidase L 'Amano” thu được từ *Aspergillus niger*, do Amano Enzyme Inc. sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2.

Kết quả là, trong các Ví dụ từ 1 đến 11C, đã xác nhận rằng tinh bột mới có cả độ nhớt cao và các đặc tính gel mạnh có thể được tạo ra bằng cách thực hiện xử lý enzym. Ngoài ra, bằng cách sử dụng  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Bacillus amyloliquefaciens* sử dụng trong Ví dụ so sánh 4-1 và 4-2, 13-1, 13-2, 16-1, 16-2 ở tỷ lệ phân giải 40% hoặc thấp hơn, không thể tạo ra tinh bột có cả độ nhớt cao và các đặc tính gel mạnh, các tính chất này là điều mà các tác giả sáng chế này mong muốn. Do vậy, đã chứng tỏ rằng tinh bột được phát triển bởi các tác giả sáng chế này là khác biệt so với tinh bột được điều chế bởi đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản được công bố trên công báo số 2,615,398.

#### Ví dụ 12A

Phương pháp điều chế  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*

ADN sợi kép được tổng hợp hóa học bằng cách bổ sung vị trí nhận biết EcoRI (GAATTC) vào cả hai đầu tận cùng của trình tự bazơ SEQ ID NO: 1 trong phần danh mục trình tự. ADN tổng hợp này được cắt hoàn toàn bởi enzym giới hạn EcoRI, được trộn với pYCDE1 (Method in Enzymology, 101,

pp.192-201 (1983)) mà đã được cắt hoàn toàn trước đó bởi EcoRI, và sau đó tiến hành nối. TG1 *E. coli* được biến nạp với dung dịch phản ứng nối và thể biến nạp mà gen tổng hợp đã được đưa vào đó một cách chính xác được chọn. Plasmid pYAMY1 được chứa bởi thể biến nạp này được tạo ra.

Theo phương pháp của Ito et al. (*J. bacteriol.*, Vol. 153, 163-168 (1983)), pYAMY1 được đưa vào tế bào chủ nấm men DBY746, và thu được thể biến nạp có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy không có tryptophan nhờ sự bù nhu cầu tryptophan. Thể biến nạp này được cấy trong 100 ml môi trường nuôi cấy tổng hợp gồm 2% glucoza, 0,67% bazơ nitơ nấm men, 24 mg/l L-uraxil, 24 mg/l L-histidin và 36 mg/l L-leuxin ở độ pH 5,7 và sau đó được nuôi cấy kèm theo lắc ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ.

Phản dịch nối thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút) của môi trường nuôi cấy được cô bằng cách sử dụng môđun màng UF loại sợi rỗng có giới hạn phân tử lượng là 10.000 để điều chế  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae*.  $\alpha$ -amylaza này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

#### Ví dụ 12B

Phương pháp điều chế  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*

ADN sợi kép được tổng hợp hóa học bằng cách bổ sung vị trí nhận biết EcoRI (GAATTC) vào cả hai đầu tận cùng của trình tự bazơ SEQ ID NO: 3 trong phần danh mục trình tự. ADN tổng hợp này được cắt hoàn toàn bởi enzym giới hạn EcoRI, được trộn với pYCDE1 (*Method in Enzymology*, 101, pp.192-201 (1983)) mà đã được cắt hoàn toàn trước đó bởi EcoRI, và sau đó tiến hành nối. TG1 *E. coli* được biến nạp với dung dịch phản ứng nối và thể

biến nạp mà gen tổng hợp đã được đưa vào đó một cách chính xác được chọn. Plasmid pYAMY2 được chứa bởi thể biến nạp này được tạo ra.

Theo phương pháp của Ito et al. (J. bacteriol., Vol. 153, 163-168 (1983)), pYAMY2 được đưa vào tế bào chủ nấm men DBY746, và thu được thể biến nạp có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy không có tryptophan nhờ sự bù nhu cầu tryptophan. Thể biến nạp này được cấy trong 100 ml môi trường nuôi cấy tổng hợp gồm 2% glucoza, 0,67% bazơ nitơ nấm men, 24 mg/l L-uraxil, 24 mg/l L-histidin và 36 mg/l L-leuxin ở độ pH 5,7 và sau đó được nuôi cấy kèm theo lắc ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ.

Phần dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút) của môi trường nuôi cấy được cô bằng cách sử dụng môđun màng UF loại sợi rỗng có giới hạn phân tử lượng là 10.000 để điều chế  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus niger*.  $\alpha$ -amylaza này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

#### Ví dụ 12C

Phương pháp điều chế amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*

ADN sợi kép được tổng hợp hóa học bằng cách bổ sung vị trí nhận biết EcoRI (GAATTC) vào cả hai đầu tận cùng của trình tự bazơ SEQ ID NO: 5 trong phần danh mục trình tự. ADN tổng hợp này được cắt hoàn toàn bởi enzym giới hạn EcoRI, được trộn với pYCDE1 (Method in Enzymology, 101, pp.192-201 (1983)) mà đã được cắt hoàn toàn trước đó bởi EcoRI, và sau đó tiến hành nối. TG1 E. coli được biến nạp với dung dịch phản ứng nối và thể biến nạp mà gen tổng hợp đã được đưa vào đó một cách chính xác được chọn. Plasmid pYGLU1 được chứa bởi thể biến nạp này được tạo ra.

Theo phương pháp của Ito et al. (J. bacteriol., Vol. 153, 163-168 (1983)), pYGLU1 được đưa vào tế bào chủ nấm men DBY746, và thu được thể biến nạp có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy không có tryptophan nhờ sự bù nhu cầu tryptophan. Thể biến nạp này được cấy trong 100 ml môi trường nuôi cấy tổng hợp gồm 2% glucoza, 0,67% bazơ nitơ nấm men, 24 mg/l L-uraxil, 24 mg/l L-histidin và 36 mg/l L-leuxin ở độ pH 5,7 và sau đó được nuôi cấy kèm theo lắc ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ.

Phần dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút) của giống nuôi cấy được cô bằng cách sử dụng môđun màng UF loại sợi rỗng có giới hạn phân tử lượng là 10.000 để điều chế amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*. Amyloglucosidaza này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

#### Ví dụ 12D

Phương pháp điều chế isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.*

ADN sợi kép được tổng hợp hóa học bằng cách bổ sung vị trí nhận biết EcoRI (GAATTC) vào cả hai đầu tận cùng của trình tự bazơ SEQ ID NO: 7 trong phần danh mục trình tự. ADN tổng hợp này được cắt hoàn toàn bởi enzym giới hạn EcoRI, được trộn với pYCDE1 (Method in Enzymology, 101, pp.192-201 (1983)) mà đã được cắt hoàn toàn trước đó bởi EcoRI, và sau đó tiến hành nối. TG1 E. coli được biến nạp với dung dịch phản ứng nối và thể biến nạp mà gen tổng hợp đã được đưa vào đó một cách chính xác được chọn. Plasmid pYISO1 được chứa bởi thể biến nạp này được tạo ra.

Theo phương pháp của Ito et al. (J. bacteriol., Vol. 153, 163-168 (1983)), pYISO1 được đưa vào tế bào chủ nấm men DBY746, và thu được thể biến nạp



có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy không có tryptophan do sự bù nhu cầu tryptophan. Thể biến nạp này được cấy trong 100 ml môi trường nuôi cấy tổng hợp gồm 2% glucoza, 0,67% bazơ nitơ nấm men, 24 mg/l L-uraxil, 24 mg/l L-histidin và 36 mg/l L-leuxin ở độ pH 5,7 và sau đó được nuôi cấy kèm theo lắc ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ.

Phần dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút) của môi trường nuôi cấy được cô bằng cách sử dụng môđun màng UF loại sợi rỗng có giới hạn phân tử lượng là 10.000 để điều chế isoamylaza thu được từ *Flavobacterium sp.* Isoamylaza này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

#### Ví dụ 12E

Phương pháp điều chế isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*

ADN sợi kép được tổng hợp hóa học bằng cách bổ sung vị trí nhận biết EcoRI (GAATTC) vào cả hai đầu tận cùng của trình tự bazơ SEQ ID NO: 9 trong phần danh mục trình tự. ADN tổng hợp này được cắt hoàn toàn bởi enzym giới hạn EcoRI, được trộn với pYCDE1 (Method in Enzymology, 101, pp.192-201 (1983)) mà đã được cắt hoàn toàn trước đó bởi EcoRI, và sau đó tiến hành nối. TG1 *E. coli* được biến nạp với dung dịch phản ứng nối và thể biến nạp mà gen tổng hợp đã được đưa vào đó một cách chính xác được chọn. Plasmid pYISO2 được chứa bởi thể biến nạp này được tạo ra.

Theo phương pháp của Ito et al. (*J. bacteriol.*, Vol. 153, 163-168 (1983)), pYISO2 được đưa vào tế bào chủ nấm men DBY746, và thu được thể biến nạp có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy không có tryptophan nhờ sự

bù nhu cầu tryptophan. Thể biến nạp này được cấy trong 100 ml môi trường nuôi cấy tổng hợp gồm 2% glucoza, 0,67% bazơ nitơ nấm men, 24 mg/l L-uraxil, 24 mg/l L-histidin và 36 mg/l L-leuxin ở độ pH 5,7 và sau đó được nuôi cấy kèm theo lắc ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ.

Phần dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút) của môi trường nuôi cấy được cô bằng cách sử dụng môđun màng UF loại sợi rỗng có giới hạn phân tử lượng là 10.000 để điều chế isoamylaza thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*. Isoamylaza này có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10.

#### Ví dụ 12A-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (thu được từ *Aspergillus oryzae*) được điều chế trong Ví dụ 12A và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5-2 dưới đây.

#### Ví dụ 12B-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của

huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (thu được từ *Aspergillus niger*) được điều chế trong Ví dụ 12B và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5-2 dưới đây.

#### Ví dụ 12C-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (thu được từ *Aspergillus niger*) được điều chế trong Ví dụ 12C và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5-2 dưới đây.

#### Ví dụ 12D-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của

huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) isoamylaza (thu được từ *Flavobacterium sp.*) được điều chế trong Ví dụ 12D và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5-2 dưới đây.

#### Ví dụ 12E-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) isoamylaza (thu được từ *Pseudomonas amyloclavata*) được điều chế trong Ví dụ 12E và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5-2 dưới đây.

Bảng 2-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng đối với tinh bột lúa mì

| Ví dụ             | Tên               | Nguồn gốc                         | Tên sản phẩm (Nhà sản xuất)                    |
|-------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| Ví dụ so sánh 1   | -                 | -                                 | Tinh bột lúa mì chưa qua xử lý                 |
| Ví dụ 1-1         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)                         |
| Ví dụ 1-2         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)                         |
| Ví dụ 1-3         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)                         |
| Ví dụ 2A          | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i>          | AMYLEX A3 (DANISCO)                            |
| Ví dụ 2B          | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i>          | Sumizyme AS (SHIN NIHON CHEMICALS Corporation) |
| Ví dụ so sánh 2   | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus subtilis</i>          | $\alpha$ -amylase 3A (HBI)                     |
| Ví dụ so sánh 3   | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus subtilis</i>          | Novamyl (Novo)                                 |
| Ví dụ so sánh 4-1 | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)            |
| Ví dụ so sánh 4-2 | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)            |
| Ví dụ so sánh 4-3 | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)            |
| Ví dụ so sánh 5   | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus licheniformis</i>     | TERMAMYL 120L (Novo)                           |
| Ví dụ so sánh 6   | $\alpha$ -amylaza | <i>Bacillus</i> sp.               | Maltogenase L (Novo)                           |
| Ví dụ 3A-1        | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                     |
| Ví dụ 3A-2        | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                     |
| Ví dụ 3A-3        | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                     |
| Ví dụ 3B          | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | OPTIDEX L-400 (Genencor)                       |
| Ví dụ 3C          | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | DIAZYME X4NP (DANISCO)                         |
| Ví dụ 3D          | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>          | Glucoamylase "Amano" SD (Amano Enzyme)         |
| Ví dụ 3E          | amyloglucosidaza  | <i>Rhizopus niveus</i>            | Gluczyme AF6 (Amano Enzyme)                    |
| Ví dụ 3F          | amyloglucosidaza  | <i>Rhizopus oryzae</i>            | Sumizyme (SHIN NIHON CHEMICALS Corporation)    |
| Ví dụ so sánh 8   | amyloglucosidaza  | <i>Candida tsukubaensis</i>       | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)            |

|                  |                       |                                                               |                                                        |
|------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Ví dụ 4          | isoamylaza            | <i>Pseudomonas amyloclavata</i>                               | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)                    |
| Ví dụ 5A         | $\alpha$ -glucosidaza | <i>Aspergillus niger</i>                                      | Transglucosidase L “Amano” (Amano Enzyme)              |
| Ví dụ 5B         | $\alpha$ -glucosidaza | <i>Aspergillus niger</i>                                      | Transglucosidase L-500 (Genencor)                      |
| Ví dụ so sánh 10 | $\beta$ -amylaza      | Lúa mạch                                                      | OPTIMAL T BBA (Genencor)                               |
| Ví dụ so sánh 11 | pullulanaza           | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                  | Pullulanase (Amano Enzyme)                             |
| Ví dụ 13-1       | CGTaza                | <i>Bacillus licheniformis</i>                                 | Toruzyme 3.0L (Novo)                                   |
| Ví dụ 13-2       | CGTaza                | <i>Paenibacillus macerans</i><br>( <i>Bacillus macerans</i> ) | Cyclodextrin glucanotransferase “Amano” (Amano Enzyme) |



Bảng 2-2: Tóm tắt các kết quả của tính bột lúa mì (Hàm lượng tinh bột đối với phương pháp amylograph: 8,5%)

| Ví dụ             | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ứng suất gãy                                          |                 | Modun Young                            |                 | Kết quả đánh giá       |
|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|------------------------|
|                   |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Giá trị đo được (g)                                   | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |                        |
| Ví dụ so sánh 1   | -                   | 621                  | 100             | 126                   | 141                                                   | 100             | 4.601.665                              | 100             | -                      |
| Ví dụ 1-1         | 5                   | 672                  | 108             | 188                   | 167                                                   | 118             | 5.188.263                              | 113             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 1-2         | 8                   | 707                  | 114             | 221                   | 185                                                   | 131             | 5.490.949                              | 119             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 1-3         | 19                  | 738                  | 119             | 279                   | 206                                                   | 146             | 5.533.540                              | 120             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 2A          | 15                  | 880                  | 142             | 365                   | 211                                                   | 150             | 5.465.779                              | 119             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 2B          | 14                  | 839                  | 135             | 374                   | 165                                                   | 117             | 5.484.457                              | 119             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ so sánh 2   | 33                  | 398                  | 64              | 241                   | 15                                                    | 11              | 637.600                                | 14              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 3   | 24                  | 14                   | 2               | 8                     | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                 |                                        |                 | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 4-1 | 5                   | 148                  | 24              | 118                   | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                 |                                        |                 | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 4-2 | 13                  | 172                  | 28              | 142                   | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                 |                                        |                 | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 4-3 | 46                  | 658                  | 106             | 302                   | 34                                                    | 24              | 1.260.110                              | 27              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 5   | 29                  | 535                  | 86              | 271                   | 37                                                    | 26              | 1.493.271                              | 32              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 6   | 20                  | 70                   | 11              | 33                    | 25                                                    | 18              | 834.422                                | 18              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ 3A-1        | 4                   | 641                  | 103             | 165                   | 218                                                   | 155             | 5.520.234                              | 120             | Có thể sử dụng         |

|                  |    |     |     |     |     |     |           |     |                           |
|------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|---------------------------|
| Ví dụ 3A-2       | 15 | 719 | 116 | 229 | 263 | 187 | 5.890.552 | 128 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3A-3       | 29 | 727 | 117 | 267 | 311 | 221 | 6.356.475 | 138 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3B         | 20 | 858 | 138 | 385 | 307 | 218 | 6.731.469 | 146 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3C         | 26 | 873 | 141 | 394 | 313 | 222 | 6.489.069 | 141 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3D         | 20 | 867 | 140 | 369 | 242 | 172 | 5.998.440 | 130 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3E         | 42 | 806 | 130 | 407 | 283 | 201 | 5.581.328 | 121 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 3F         | 43 | 808 | 130 | 403 | 286 | 203 | 5.941.241 | 129 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ so sánh 8  | 5  | 736 | 119 | 263 | 119 | 84  | 4.096.046 | 89  | Không thể sử dụng<br>được |
| Ví dụ 4          | 6  | 828 | 133 | 300 | 297 | 211 | 6.987.728 | 152 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 5A         | 4  | 746 | 120 | 291 | 166 | 118 | 5.142.993 | 112 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 5B         | 5  | 554 | 89  | 274 | 180 | 128 | 6.418.528 | 139 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ so sánh 10 | 7  | 757 | 122 | 256 | 145 | 103 | 4.385.924 | 95  | Không thể sử dụng<br>được |
| Ví dụ so sánh 11 | 4  | 601 | 97  | 245 | 140 | 99  | 4.534.673 | 99  | Không thể sử dụng<br>được |
| Ví dụ 13-1       | 14 | 444 | 71  | 422 | 161 | 114 | 5.136.339 | 112 | Có thể sử dụng            |
| Ví dụ 13-2       | 12 | 475 | 76  | 460 | 159 | 113 | 5.291.915 | 115 | Có thể sử dụng            |

Bảng 3-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng cho tinh bột ngô

| Ví dụ              | Tên                   | Nguồn gốc                         | Tên sản phẩm (Nhà sản xuất)               |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| Ví dụ ss 12        | -                     | -                                 | Tinh bột ngô chưa qua xử lý               |
| Ví dụ 6            | $\alpha$ -amylaza     | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)                    |
| Ví dụ so sánh 13-1 | $\alpha$ -amylaza     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)       |
| Ví dụ so sánh 13-2 | $\alpha$ -amylaza     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)       |
| Ví dụ 7-1          | amylglucosidaza       | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                |
| Ví dụ 7-2          | amylglucosidaza       | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                |
| Ví dụ so sánh 14   | $\beta$ -amylaza      | Lúa mạch                          | OPTIMAL T BBA (Genencor)                  |
| Ví dụ 8A           | isoamylaza            | <i>Pseudomonas amyloclavata</i>   | Reagent (Sigma-Aldrich Corporation)       |
| Ví dụ 8B           | $\alpha$ -amylaza     | <i>Aspergillus niger</i>          | AMYLEX A3 (DANISCO)                       |
| Ví dụ 8C           | $\alpha$ -glucosidaza | <i>Aspergillus niger</i>          | Transglucosidase L “Amano” (Amano Enzyme) |
| Ví dụ 14           | CGTaza                | <i>Bacillus licheniformis</i>     | Toruzyme 3.0L (Novo)                      |

Bảng 3-2: Tóm tắt các kết quả của tính bột ngô (Hàm lượng tinh bột đối với phương pháp amylograph: 7,0%)

| Ví dụ              | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ứng suất gãy        |                 | Môđun Young                            |                 | Kết quả đánh giá       |
|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|------------------------|
|                    |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Giá trị đo được (g) | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |                        |
| Ví dụ so sánh 12   | -                   | 476                  | 100             | 182                   | 171                 | 100             | 5.603.029                              | 100             | -                      |
| Ví dụ 6            | 8                   | 425                  | 89              | 161                   | 230                 | 135             | 6.054.798                              | 108             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ so sánh 13-1 | 11                  | 414                  | 87              | 162                   | 56                  | 33              | 2.434.858                              | 43              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 13-2 | 40                  | 383                  | 80              | 141                   | 153                 | 90              | 4.318.913                              | 77              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ 7-1          | 11                  | 455                  | 96              | 153                   | 381                 | 223             | 7.805.888                              | 139             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 7-2          | 33                  | 432                  | 91              | 170                   | 348                 | 204             | 6.219.387                              | 111             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ so sánh 14   | 1                   | 477                  | 100             | 152                   | 183                 | 107             | 5.582.293                              | 100             | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ 8A           | 1                   | 445                  | 93              | 163                   | 216                 | 126             | 6.304.730                              | 113             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 8B           | 23                  | 414                  | 87              | 176                   | 297                 | 174             | 5.910.873                              | 105             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 8C           | 1                   | 451                  | 95              | 163                   | 220                 | 129             | 6.731.402                              | 120             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 14           | 7                   | 285                  | 60              | 273                   | 222                 | 130             | 6.546.236                              | 117             | Có thể sử dụng         |

Bảng 4-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng cho tinh bột sắn

| Ví dụ              | Tên                   | Nguồn gốc                         | Tên sản phẩm (Nhà sản xuất)               |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| Ví dụ so sánh 15   | -                     | -                                 | Tinh bột sắn chưa qua xử lý               |
| Ví dụ 9            | $\alpha$ -amylaza     | <i>Aspergillus oryzae</i>         | Biozyme (Amano Enzyme)                    |
| Ví dụ so sánh 16-1 | $\alpha$ -amylaza     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Chất phản ứng (Sigma-Aldrich Corporation) |
| Ví dụ so sánh 16-2 | $\alpha$ -amylaza     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Chất phản ứng (Sigma-Aldrich Corporation) |
| Ví dụ 10-1         | amylloglucosidaza     | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                |
| Ví dụ 10-2         | amylloglucosidaza     | <i>Aspergillus niger</i>          | AMG (Novo)                                |
| Ví dụ so sánh 17   | $\beta$ -amylaza      | Lúa mạch                          | OPTIMAL T BBA (Genencor)                  |
| Ví dụ 11A          | isoamylaza            | <i>Pseudomonas amyloclavata</i>   | Chất phản ứng (Sigma-Aldrich Corporation) |
| Ví dụ 11B          | $\alpha$ -amylaza     | <i>Aspergillus niger</i>          | AMYLEX A3(DANISCO)                        |
| Ví dụ 11C          | $\alpha$ -glucosidaza | <i>Aspergillus niger</i>          | Transglucosidase L “Amano” (Amano Enzyme) |
| Ví dụ 15           | CGTaza                | <i>Bacillus licheniformis</i>     | Toruzyme 3.0L(Novo)                       |

Bảng 4-2: Tóm tắt các kết quả đối với tính bột sản (Hàm lượng tinh bột đối với phương pháp amylograph: 6,0%)

| Ví dụ              | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ứng suất gãy                                          |                 | Môđun Young                            |                 | Kết quả đánh giá       |
|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|------------------------|
|                    |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Giá trị đo được (g)                                   | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |                        |
| Ví dụ so sánh 15   | -                   | 757                  | 100             | 509                   | 51                                                    | 100             | 472.273                                | 100             | -                      |
| Ví dụ 9            | 6                   | 737                  | 97              | 434                   | 60                                                    | 118             | 567.949                                | 120             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ so sánh 16-1 | 11                  | 271                  | 36              | 256                   | 21                                                    | 41              | 225.310                                | 48              | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ so sánh 16-2 | 34                  | 112                  | 15              | 109                   | Không xác định được vì không tạo thành gel do quá mềm |                 |                                        |                 | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ 10-1         | 11                  | 704                  | 93              | 419                   | 71                                                    | 139             | 715.243                                | 151             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 10-2         | 28                  | 660                  | 87              | 388                   | 115                                                   | 225             | 1.390.964                              | 295             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ so sánh 17   | 2                   | 755                  | 100             | 440                   | 52                                                    | 102             | 494.672                                | 105             | Không thể sử dụng được |
| Ví dụ 11A          | 2                   | 642                  | 85              | 377                   | 75                                                    | 147             | 701.944                                | 149             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 11B          | 16                  | 561                  | 74              | 328                   | 89                                                    | 175             | 969.841                                | 205             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 11C          | 2                   | 638                  | 84              | 374                   | 70                                                    | 137             | 663.407                                | 140             | Có thể sử dụng         |
| Ví dụ 15           | 7                   | 533                  | 70              | 529                   | 92                                                    | 180             | 2.342.930                              | 496             | Có thể sử dụng         |



Bảng 5-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng khi enzym điều chế được bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền được phản ứng với tinh bột lúa mì

| Ví dụ           | Tên               | Nguồn gốc                       | Tên sản phẩm (Nhà sản xuất)    |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Ví dụ so sánh 1 | -                 | -                               | Tinh bột lúa mì chưa qua xử lý |
| Ví dụ 12A-1     | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus oryzae</i>       | SEQ ID NO: 2                   |
| Ví dụ 12B-1     | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i>        | SEQ ID NO: 4                   |
| Ví dụ 12C-1     | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i>        | SEQ ID NO: 6                   |
| Ví dụ 12D-1     | isoamylaza        | <i>Flavobacterium sp.</i>       | SEQ ID NO: 8                   |
| Ví dụ 12E-1     | isoamylaza        | <i>Pseudomonas amyloclavata</i> | SEQ ID NO: 10                  |

Bảng 5-2: Tóm tắt các kết quả khi enzym điều chế được bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền được phản ứng với tinh bột  
lúa mì (Hàm lượng tinh bột đối với phương pháp amylograph: 8,5%)

| Ví dụ           | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ứng suất gãy        |                 | Môđun Young                            |                 | Kết quả đánh giá |
|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|------------------|
|                 |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Giá trị đo được (g) | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |                  |
| Ví dụ so sánh 1 | -                   | 621                  | 100             | 81                    | 141                 | 100             | 4.601.665                              | 100             | -                |
| Ví dụ 12A-1     | 25                  | 785                  | 126             | 403                   | 252                 | 179             | 5.785.782                              | 126             | Có thể sử dụng   |
| Ví dụ 12B-1     | 15                  | 797                  | 128             | 309                   | 281                 | 199             | 6.712.299                              | 146             | Có thể sử dụng   |
| Ví dụ 12C-1     | 26                  | 806                  | 130             | 407                   | 378                 | 268             | 6.973.739                              | 152             | Có thể sử dụng   |
| Ví dụ 12D-1     | 6                   | 781                  | 126             | 306                   | 285                 | 202             | 6.425.189                              | 140             | Có thể sử dụng   |
| Ví dụ 12E-1     | 6                   | 775                  | 125             | 297                   | 263                 | 187             | 6.483.006                              | 141             | Có thể sử dụng   |

### Ví dụ sản xuất thử nghiệm

Tiếp theo, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các Ví dụ sản xuất thử nghiệm, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ sản xuất thử nghiệm này. Trừ khi có chỉ dẫn khác, "phần" có nghĩa là "phần theo khối lượng".

### Ví dụ sản xuất thử nghiệm 1: Sản xuất bánh quy

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây, bơ không chứa muối và mỡ trừa được đặt trong thiết bị trộn và sau đó được trộn kĩ. Ngoài ra, đường trắng mềm và muối thông thường được bổ sung, được trộn kĩ, và sau đó amoni hydro cacbonat đã được hòa tan trong nước từ trước được bổ sung và được trộn kĩ. Cuối cùng, mẩu bột thu được bằng cách trộn trước bột mì mềm, tinh bột và  $\text{NaHCO}_3$  (natri hydro cacbonat) được bổ sung, sau đó trộn kĩ cho đến khi khối bột nhão được tạo thành. Khối bột nhão này được dàn mỏng bằng cách sử dụng trục cán, được cắt bằng cách sử dụng khuôn và sau đó được nướng trong lò (ở nhiệt độ  $200^\circ\text{C}$  trong 15 phút) để sản xuất bánh quy.

Bảng 10

| Chế phẩm<br>(các phần)                                          | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm so<br>sánh 1-1 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm so<br>sánh 1-2 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm so<br>sánh 1-3 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm so<br>sánh 1-4 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm 1-1 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm 1-2 |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Bột mì mềm                                                      | 150                                         | 150                                         | 150                                         | 150                                         | 150                              | 150                              |
| Tinh bột sản chưa được cải<br>biến hóa học <sup>Lưu ý (4)</sup> | 150                                         | -                                           | -                                           | -                                           | -                                | -                                |
| Tinh bột sản được cải biến<br>hóa học 1 <sup>Lưu ý (1)</sup>    | -                                           | 150                                         | -                                           | -                                           | -                                | -                                |
| Tinh bột sản được cải biến<br>hóa học 2 <sup>Lưu ý (2)</sup>    | -                                           | -                                           | 150                                         | -                                           | -                                | -                                |
| Tinh bột sản được cải biến<br>hóa học 3 <sup>Lưu ý (3)</sup>    | -                                           | -                                           | -                                           | 150                                         | -                                | -                                |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 9                         | -                                           | -                                           | -                                           | -                                           | 150                              | -                                |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 10-2                      | -                                           | -                                           | -                                           | -                                           | -                                | 150                              |
| Đường trắng mềm                                                 | 120                                         | 120                                         | 120                                         | 120                                         | 120                              | 120                              |
| Bơ không chứa muối                                              | 60                                          | 60                                          | 60                                          | 60                                          | 60                               | 60                               |
| Mỡ trư                                                          | 60                                          | 60                                          | 60                                          | 60                                          | 60                               | 60                               |
| Amoni hydro cacbonat                                            | 3                                           | 3                                           | 3                                           | 3                                           | 3                                | 3                                |
| Natri hydrocacbonat                                             | 3                                           | 3                                           | 3                                           | 3                                           | 3                                | 3                                |
| Muối thông thường                                               | 1                                           | 1                                           | 1                                           | 1                                           | 1                                | 1                                |
| Nước                                                            | 34                                          | 34                                          | 34                                          | 34                                          | 34                               | 34                               |

Lưu ý (1): Tinh bột sản được cải biến hóa học 1: “RK-08”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất

Lưu ý (2): Tinh bột sản được cải biến hóa học 2: “CHEMISTAR 280”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất “CHEMISTAR” là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.

Lưu ý (3): Tinh bột sản được cải biến hóa học 3: “CHEMISTAR 300S”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất “CHEMISTAR” là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.

Lưu ý (4): Tinh bột sản chưa được cải biến hóa học: tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý.

Bánh quy thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả bánh quy của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 1-1 và 1-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 và 10-2, là mềm và có kết cấu với khả năng tan tốt trong miệng so với bánh quy của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh từ 1 đến 4, cứng và giòn, và còn có kết cấu với sự tan kém trong miệng. Cụ thể, bánh quy của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 1-1 và 1-2 có kết cấu rất nhẹ và dễ ăn. Đối với bột nhào tại thời điểm tạo hình, cả bột nhào của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 1-1 và 1-2 đều rất khô và không dính so với bột nhào của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh từ 1-1 đến 1-4, và không dính vào tay, trục cán và các dụng cụ tương tự, và cũng thể hiện khả năng hoạt động rất tốt.

#### Ví dụ sản xuất thử nghiệm 2: Sản xuất bánh xốp

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây, trứng nguyên quả và đường hạt được làm ấm đến gần nhiệt độ cơ thể trong khi trộn bằng cách sử dụng thiết bị trộn thủ công. Ngoài ra, hỗn hợp được khuấy bằng thiết bị trộn thủ công cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp có độ nhớt, bột mịn và trạng thái hơi trắng hoàn toàn. Mẩu bột thu được bằng cách trộn trước bột mì mềm, tinh bột và gluten lúa mì được bổ sung qua rây vào hỗn hợp, sau đó là trộn bằng cách sử dụng dao trộn. Cuối cùng, hỗn hợp của bơ nóng chảy và sữa được bổ sung và được trộn. Hỗn hợp thu được được rót vào khuôn và sau đó được nướng trong lò (ở nhiệt độ 200°C trong 15 phút, sau đó ở nhiệt độ 190°C trong 18 phút) để sản xuất bánh xốp.

Bảng 11

| Chế phẩm<br>(Các phần)                                            | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 2-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 2-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>2-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>2-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 2-3 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 2-4 |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Bột mì mềm                                                        | 50                                             | 50                                             | 50                                     | 50                                     | 50                                  | 50                                  |
| Tinh bột lúa mì chưa được cải<br>biến hóa học <sup>Lưu ý 3)</sup> | 40                                             | —                                              | —                                      | —                                      | —                                   | —                                   |
| Tinh bột lúa mì được cải biến<br>hóa học <sup>Lưu ý 1)</sup>      | —                                              | 40                                             | —                                      | —                                      | —                                   | —                                   |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 1-3                         | —                                              | —                                              | 40                                     | —                                      | —                                   | —                                   |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 2A                          | —                                              | —                                              | —                                      | 40                                     | —                                   | —                                   |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 3A-3                        | —                                              | —                                              | —                                      | —                                      | 40                                  | —                                   |
| Tinh bột được điều chế trong<br>Ví dụ 5A                          | —                                              | —                                              | —                                      | —                                      | —                                   | 40                                  |
| Gluten lúa mì <sup>Lưu ý 2)</sup>                                 | 4,5                                            | 4,5                                            | 4,5                                    | 4,5                                    | 4,5                                 | 4,5                                 |
| Trứng nguyên quả                                                  | 170                                            | 170                                            | 170                                    | 170                                    | 170                                 | 170                                 |
| Đường hạt                                                         | 100                                            | 100                                            | 100                                    | 100                                    | 100                                 | 100                                 |
| Bơ không chứa muối                                                | 35                                             | 35                                             | 35                                     | 35                                     | 35                                  | 35                                  |
| Sữa                                                               | 25                                             | 25                                             | 25                                     | 25                                     | 25                                  | 25                                  |

Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học: “MIDSOL 1020”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất

Lưu ý (2): Gluten lúa mì: “Fineglu VP”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất “Fineglu” là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.

Lưu ý (3): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.



Bánh xốp thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, tất cả các bánh xốp của Ví dụ sản xuất thử nghiệm từ 2-1 đến 2-4, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3, 2A, 3A-3 và 5A, thể hiện sự trương nở tốt sau khi nướng và có thể tích lớn, và cũng có kết cấu mềm và phòng tốt so với bánh xốp của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 2-1 và Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 2-2.

#### Ví dụ sản xuất thử nghiệm 3: Sản xuất kem sữa trứng

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 12 dưới đây, đường hạt được bổ sung vào lòng đỏ trứng đã được nhào kỹ bằng máy đánh trứng, sau đó được trộn bằng máy đánh trứng. Mẫu bột thu được bằng cách trộn trước bột mì mềm và tinh bột được bổ sung qua rây vào hỗn hợp, sau đó là trộn. Ngoài ra, sữa ấm được bổ sung và được trộn với hỗn hợp, hỗn hợp được lọc và được đặt trong chảo, và sau đó được gia nhiệt. Hỗn hợp được khuấy bằng dao trộn bằng gỗ cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp có độ nhớt và trạng thái trơn mịn. Cuối cùng, bơ, chất màu thực phẩm và hương vani được bổ sung và được trộn với hỗn hợp để sản xuất kem sữa trứng.

Bảng 12

| Chế phẩm<br>(các phần)                                                    | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh<br>3-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh<br>3-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 3-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 3-2 |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sữa                                                                       | 300                                               | 300                                               | 300                                 | 300                                 |
| Lòng đỏ trứng                                                             | 35                                                | 35                                                | 35                                  | 35                                  |
| Đường hạt                                                                 | 60                                                | 60                                                | 60                                  | 60                                  |
| Bột mì mềm                                                                | 10                                                | 10                                                | 10                                  | 10                                  |
| Tinh bột lúa mì<br>chưa được cải<br>biến hóa học <sup>Lưu ý<br/>(3)</sup> | 10                                                | -                                                 | -                                   | -                                   |
| Tinh bột lúa mì<br>được cải biến hóa<br>học <sup>Lưu ý (1)</sup>          | -                                                 | 10                                                | -                                   | -                                   |
| Tinh bột được<br>điều chế trong Ví<br>dụ 1-3                              | -                                                 | -                                                 | 10                                  | -                                   |
| Tinh bột được<br>điều chế trong Ví<br>dụ 3A-3                             | -                                                 | -                                                 | -                                   | 10                                  |
| Bơ không chứa<br>muối                                                     | 15                                                | 15                                                | 15                                  | 15                                  |
| KUCHINA<br>COLOR 400LS<br><sup>Lưu ý (2)</sup>                            | lượng thích<br>hợp                                | lượng thích<br>hợp                                | lượng thích<br>hợp                  | lượng thích<br>hợp                  |
| Hương vani                                                                | lượng thích<br>hợp                                | lượng thích<br>hợp                                | lượng thích<br>hợp                  | lượng thích<br>hợp                  |

*Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học: "MIDSOL 1020", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): KUCHINA COLOR 400LS: chất màu thực phẩm màu vàng của cây dành dành. "KUCHINA COLOR" là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.*

*Lưu ý (3): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: Tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.*

Kem sữa trứng thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả kem sữa trứng của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 3-1 và 3-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3 và 3A-3, có khả năng lưu giữ hình dạng và hình khối thích hợp, và có khả năng tan tốt trong miệng và kết

cầu trơn mịn. Mặt khác, kem sữa trứng của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 3-1 có tính chất vật lý giống như gel và kết cấu nặng, và còn có sự tan kém trong miệng và độ trơn mịn kém. Ngoài ra, kem sữa trứng của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 3-2 có khả năng lưu giữ hình dạng và hình khối kém, và có kết cấu với độ dính và sự tan kém trong miệng.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 4: Sản xuất bánh putđinh sữa

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 13 dưới đây, đường hạt được bổ sung vào sữa và được trộn kỹ bằng cách sử dụng dao trộn bằng gỗ để hòa tan đường hạt. Malt tinh bột được bổ sung vào hỗn hợp và được trộn kỹ bằng cách sử dụng dao trộn bằng gỗ. Hỗn hợp được gia nhiệt trong khi khuấy bằng dao trộn bằng gỗ cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp có độ nhớt và trạng thái trơn mịn. Hỗn hợp được đổ vào cốc thạch và được làm lạnh trong bể đá để sản xuất bánh putđinh sữa.

Bảng 13

| Chế phẩm<br>(các phần)                                                | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 4-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 4-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 4-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 4-2 |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sữa                                                                   | 170                                            | 170                                            | 170                                 | 170                                 |
| Đường hạt                                                             | 10                                             | 10                                             | 10                                  | 10                                  |
| Tinh bột lúa mì<br>chưa được cải biến<br>hóa học <sup>Lưu ý (2)</sup> | 10                                             | -                                              | -                                   | -                                   |
| Tinh bột lúa mì<br>được cải biến hóa<br>học <sup>Lưu ý (1)</sup>      | -                                              | 10                                             | -                                   | -                                   |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 1-<br>3                         | -                                              | -                                              | 10                                  | -                                   |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ<br>3A-3                         | -                                              | -                                              | -                                   | 10                                  |

*Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học: "MIDSOL 1020", do GLICO FOODS CO.,*

*LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: Tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.*

Bánh putđinh sữa thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả bánh putđinh sữa của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 4-1 và 4-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3 và 3A-3, có độ dính và khả năng nhai và còn có khả năng tan tốt trong miệng và kết cấu trơn mịn. Mặt khác, bánh putđinh sữa của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 4-1 dính nhưng có kết cấu với độ cứng như sữa chua cứng và do vậy kém hơn về cả sự tan trong miệng và độ trơn mịn so với bánh putđinh sữa của Ví dụ sản xuất thử nghiệm. Ngoài ra, bánh putđinh sữa của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 4-2 không được tạo gel bền vững và có kết cấu với độ dính, và còn có sự tan kém trong miệng.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 5: Sản xuất bánh tinh bột sẵn dây

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 14 dưới đây, hỗn hợp của mẫu tinh bột và đường trắng mềm được bổ sung nước và đường trắng mềm được hòa tan bằng cách trộn kỹ bằng dao trộn bằng gỗ. Hỗn hợp được gia nhiệt trong khi khuấy sử dụng dao trộn bằng gỗ cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp nhão với độ nhớt và trạng thái trong suốt. Hỗn hợp được rót vào khuôn và được làm lạnh trong bể nước đá để sản xuất bánh tinh bột sẵn dây.

Bảng 14

| Chế phẩm<br>(Các phần)                                               | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 5-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 5-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 5-3 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>5-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>5-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>5-3 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>5-4 |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Tinh bột lúa mì<br>được lên men                                      | 56                                             | -                                              | -                                              | -                                      | -                                      | -                                      | -                                      |
| Tinh bột lúa mì<br>chưa được cải biến<br>hóa học<br><i>Lưu ý (2)</i> | -                                              | 56                                             | -                                              | -                                      | -                                      | -                                      | -                                      |
| Tinh bột lúa mì<br>được cải biến hóa<br>học<br><i>Lưu ý (1)</i>      | -                                              | -                                              | 56                                             | -                                      | -                                      | -                                      | -                                      |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 1-3                            | -                                              | -                                              | -                                              | 56                                     | -                                      | -                                      | -                                      |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 2A                             | -                                              | -                                              | -                                              | -                                      | 56                                     | -                                      | -                                      |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 3A-<br>3                       | -                                              | -                                              | -                                              | -                                      | -                                      | 56                                     | -                                      |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 5A                             | -                                              | -                                              | -                                              | -                                      | -                                      | -                                      | 56                                     |
| Đường trắng mềm                                                      | 32                                             | 32                                             | 32                                             | 32                                     | 32                                     | 32                                     | 32                                     |
| Nước                                                                 | 280                                            | 280                                            | 280                                            | 280                                    | 280                                    | 280                                    | 280                                    |

*Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học: "MIDSOL 1020", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: Tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.*

Bánh tinh bột sắn dây thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, tất cả các bánh tinh bột sắn dây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm từ 5-1 đến 5-4, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3, 2A, 3A-3 và 5A, có độ cứng và độ giòn thích hợp, và có độ nhót đàn hồi và kết cấu dính thích hợp. So với bánh tinh bột sắn dây được gọi như vậy ở vùng Kanto trong Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 5-1, trong đó sử dụng tinh bột lúa mì đã lên men thu được bằng cách lên men trong một thời gian dài, ví dụ, một hoặc nhiều năm, bánh tinh bột sắn dây có kết cấu giống hệt có thể được tạo ra mà không cần phải lên men trong một thời gian dài trong Ví dụ sản xuất thử nghiệm. Ngoài ra, bánh tinh bột sắn dây thu được có mùi vị dễ chịu mà không có mùi vị khác thường có nguồn gốc từ tinh bột lúa mì đã lên men và mùi lên men. Mặt khác, bánh tinh bột sắn dây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 5-2 cứng và dễ vỡ, và có kết cấu với độ dính trong miệng. Ngoài ra, bánh tinh bột sắn dây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 5-3 có kết cấu mềm và dễ vỡ và thể hiện kết cấu khác xa với kết cấu của bánh tinh bột sắn dây được gọi như vậy ở vùng Kanto, cùng với bánh tinh bột sắn dây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 5-2 và Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 5-3.

#### Ví dụ sản xuất thử nghiệm 6: Sản xuất đậu phụ vùng (goma-dofu)

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 15 dưới đây, mẫu tinh bột được bổ sung vào nước và hỗn hợp được gia nhiệt trong khi khuấy bằng dao trộn bằng gỗ cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp nhão với độ nhót và trạng thái trong suốt. Bột vùng nhão được bổ sung vào đó và được trộn kĩ. Hỗn hợp được đổ vào đồ chứa và sau đó được làm nguội để thu được đậu phụ vùng (goma-dofu).



Bảng 15

| Chế phẩm<br>(Các phần)                                                | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm so<br>sánh 6-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm so<br>sánh 6-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm 6-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm 6-<br>2 |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|
| Bột vừng nhão                                                         | 50                                                 | 50                                                 | 50                                      | 50                                          |
| Tinh bột lúa mì chưa<br>được cải biến hóa<br>học <sup>Lưu ý (2)</sup> | 30                                                 | -                                                  | -                                       | -                                           |
| Tinh bột lúa mì được<br>cải biến hóa học <sup>Lưu ý<br/>(1)</sup>     | -                                                  | 30                                                 | -                                       | -                                           |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 1-3                             | -                                                  | -                                                  | 30                                      | -                                           |
| Tinh bột được điều<br>chế trong Ví dụ 3A-3                            |                                                    |                                                    | -                                       | 30                                          |
| Nước                                                                  | 300                                                | 300                                                | 300                                     | 300                                         |

*Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học: "MIDSOL 1020", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: Tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.*

Đậu phụ vừng (goma-dofu) thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả đậu phụ vừng (goma-dofu) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 6-1 và 6-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3 và 3A-3, có kết cấu dính thích hợp và cảm giác giòn thích hợp trái ngược với kết cấu với độ dẻo cao như kết cấu thu được bằng cách bổ sung bột sắn dây, và có kết cấu dễ ăn với độ dính ít hơn và sự dính trong miệng ít hơn. Như vậy, có thể hi vọng rằng đậu phụ vừng (goma-dofu) thu được được áp dụng cho thực phẩm dùng cho người cao tuổi chẳng hạn. Mặt khác, đậu phụ vừng (goma-dofu) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 6-1 có kết cấu mềm và dính cao và đậu phụ vừng (goma-dofu) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 6-2 có kết cấu cứng và dễ vỡ, nhưng không có độ dẻo hay kết cấu dính, và do đó cả đậu phụ vừng (goma-dofu) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 6-1 và Ví dụ sản xuất thử nghiệm

so sánh 6-2 đều kém hơn về độ ngon và tính dễ ăn.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 7: Sản xuất bánh cá của Nhật (kamaboko)

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây, patê cá, muối thông thường, đường, mononatri glutamat và kali sorbat được đặt trong thiết bị trộn (tĩnh) và được trộn kỹ cho đến khi hỗn hợp có độ nhót. Để ức chế sự tăng nhiệt độ của patê cá, nửa lượng hơi ẩm với nước đá được bổ sung vào đó và được trộn. Sau đó, lòng trắng trứng, Mirin và tinh bột đã được tạo huyền phù trước trong nước còn lại với nước đá được bổ sung vào đó và được trộn kỹ cho đến khi thu được hỗn hợp đồng nhất. Chỉ báo nhiệt độ của patê cá sau khi trộn là nằm trong khoảng từ 10 đến 15°C. Patê cá đã được trộn được khử khí và được đổ vào khuôn. Sau khi đổ đầy, khuôn đã được đổ đầy patê cá đã trộn được tiệt trùng (ở nhiệt độ 90°C trong 40 phút) và được làm nguội để sản xuất bánh cá của Nhật (kamaboko).

Bảng 16

| Chế phẩm (các phần)                                                 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-2 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-3 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 7-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 7-2 |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Patê cá                                                             | 100                                   | 100                                   | 100                                   | 100                           | 100                           |
| Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học <small>Lưu ý (3)</small> | 15                                    | -                                     | -                                     | -                             | -                             |
| Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học 1 <small>Lưu ý (1)</small>    | -                                     | 15                                    | -                                     | -                             | -                             |
| Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học 2 <small>Lưu ý (2)</small>    | -                                     | -                                     | 15                                    | -                             | -                             |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3                              | -                                     | -                                     | -                                     | 15                            | -                             |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 3A-3                             | -                                     | -                                     | -                                     | -                             | 15                            |
| Muối thông thường                                                   | 3                                     | 3                                     | 3                                     | 3                             | 3                             |
| Đường                                                               | 2,5                                   | 2,5                                   | 2,5                                   | 2,5                           | 2,5                           |
| Lòng trắng trứng                                                    | 5                                     | 5                                     | 5                                     | 5                             | 5                             |
| Mirin                                                               | 4                                     | 4                                     | 4                                     | 4                             | 4                             |

|                    |     |     |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Mononatri glutamat | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Kali sorbat        | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Nước với nước đá   | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  |

Lưu ý (1): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học 1: “MIDSOL 1020”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất

Lưu ý (2): Tinh bột lúa mì được cải biến hóa học 2: “Ginrin”, do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất “Ginrin” là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.

Lưu ý (3): Tinh bột lúa mì chưa được cải biến hóa học: Tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý.

Vào ngày sản xuất tiếp theo và sau một tuần, bánh cá của Nhật (kamaboko) thu được được tiến hành thử nghiệm cảm quan. Bánh cá của Nhật (kamaboko) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-1 có kết cấu với độ dẻo kém hơn một chút và cũng không có khả năng nhai tốt. Bánh cá của Nhật (kamaboko) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-2 có độ cứng nhưng có kết cấu cứng, và sự phân giải của tinh bột cũng tăng trong thử nghiệm cảm quan sau khi làm lạnh trong một tuần, và do đó bánh cá của Nhật (kamaboko) này thể hiện kết cấu khô và nhạt cùng với sự phân tách của nước. Bánh cá của Nhật (kamaboko) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 7-3 dường như ít gây ra sự thay đổi do sự phân giải theo thời gian hơn vì cấu trúc của tinh bột, nhưng lại thể hiện kết cấu nhờn với độ dẻo kém. So với các Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh này, cả bánh cá của Nhật (kamaboko) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 7-1 và 7-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 1-3 và 3A-3, có độ dẻo với khả năng nhai tốt và còn gây ra ít sự thay đổi theo thời gian hơn.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 8: Sản xuất lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango)

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 17 dưới đây, mẫu tinh bột được tạo huyền phù trước trong một phần nước. Tổng lượng đường trắng mềm, nước tương đen, Mirin, xi-rô tinh bột và phần nước còn lại được đặt trong chảo và sau đó được trộn kỹ bằng dao trộn bằng gỗ. Ngoài ra, mẫu tinh bột đã được tạo huyền phù trước trong nước được bổ sung vào hỗn hợp và được gia nhiệt trong khi khuấy bằng dao trộn bằng gỗ. Hỗn hợp được gia nhiệt cho đến khi hỗn hợp trở thành hỗn hợp nhão với độ nhớt và trạng thái trong suốt, để sản xuất lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango).

Bảng 17

| Chế phẩm<br>(các phần)                                                 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm so<br>sánh 8-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm so<br>sánh 8-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm 8-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>thử nghiệm 8-2 |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Đường trắng mềm                                                        | 95                                                 | 95                                                 | 95                                      | 95                                      |
| Nước tương đen                                                         | 80                                                 | 80                                                 | 80                                      | 80                                      |
| Mirin                                                                  | 35                                                 | 35                                                 | 35                                      | 35                                      |
| Xi-rô tinh bột                                                         | 8                                                  | 8                                                  | 8                                       | 8                                       |
| Tinh bột sản chưa<br>được cải biến hóa<br>học <small>Lưu ý (2)</small> | 10                                                 | -                                                  | -                                       | -                                       |
| Tinh bột sản được<br>cải biến hóa học<br><small>Lưu ý (1)</small>      | -                                                  | 10                                                 | -                                       | -                                       |
| Tinh bột được<br>điều chế trong Ví<br>dụ 9                             | -                                                  | -                                                  | 10                                      | -                                       |
| Tinh bột được<br>điều chế trong Ví<br>dụ 10-2                          | -                                                  | -                                                  | -                                       | 10                                      |
| Nước                                                                   | 70                                                 | 70                                                 | 70                                      | 70                                      |

*Lưu ý (1): Tinh bột sản được cải biến hóa học: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột sản chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý.*

Lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango) thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 8-1 và 8-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 và 10-2, đều có khả năng duy trì hình dạng và hình khối tốt, và đường như ít nhỏ giọt hơn vì sự kết dính tốt bên trên dango, và còn có cảm giác tạo thành sợi và độ dính ít hơn và có kết cấu trơn mịn. Mặt khác, lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 8-1 có tính chất vật lý giống như gel và kết cấu nặng, và còn có sự tan kém trong miệng và không có độ trơn mịn. Lớp trắng cho bánh trôi của Nhật (mitarashi dango) của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so



sánh 8-2 có khả năng duy trì hình dạng kém và hình khối kém và gây ra sự nhỏ giọt vì sự kết dính kém bên trên dango, và còn có kết cấu với độ dính và sự tan kém trong miệng. Ví dụ, trong quá trình phân phối lạnh cá chình đã được cắt và nướng, để ngăn nước xốt cay cho cá chình đã được cắt và nướng không nhỏ giọt tại thời điểm tan đông, nước xốt cay có độ nhớt cao và khả năng duy trì hình dạng và hình khối tốt đôi khi có thể được sử dụng trong bước nướng cuối cùng. Tuy nhiên, có vấn đề là nước xốt cay có độ nhớt cao thường có độ dính mạnh hoặc ở dạng giống như gel, và còn có tính chất vật lý giống như cá đã được đông và kết cấu nặng. Việc sử dụng tinh bột đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể tạo ra cá đã được cắt và nướng mà dường như ít nhỏ giọt hơn vì sự kết dính tốt bên trên cá chình và các loại cá tương tự, và có cảm giác tạo thành sợi và độ dính ít hơn, và có kết cấu trơn mịn.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 9: Sản xuất nước xốt trái cây

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 18 dưới đây, mẫu tinh bột được tạo huyền phù trước trong một phần nước. Bột trái cây nhuyễn, đường trắng mềm, nước ép chanh và tổng lượng của phần nước còn lại được đặt trong chảo và được gia nhiệt có khuấy bằng dao trộn bằng gỗ. Ngoài ra, mẫu tinh bột đã được tạo huyền phù trước trong nước được bổ sung vào hỗn hợp. Hỗn hợp được gia nhiệt cho đến khi hỗn hợp này trở thành hỗn hợp nhão với độ nhớt và trạng thái trong suốt để tạo ra nước xốt trái cây.

Bảng 18

| Chế phẩm<br>(các phần) | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 9-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 9-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 9-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 9-2 |
|------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Bột trái cây nhuyễn    | 100                                            | 100                                            | 100                                 | 100                                 |
| Đường trắng mềm        | 10                                             | 10                                             | 10                                  | 10                                  |

|                                                              |    |    |    |    |
|--------------------------------------------------------------|----|----|----|----|
| Tinh bột sắn chưa được cải biến hóa học <sup>Lưu ý (2)</sup> | 3  | -  | -  | -  |
| Tinh bột sắn được cải biến hóa học <sup>Lưu ý (1)</sup>      | -  | 3  | -  | -  |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9                         | -  | -  | 3  | -  |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 10-2                      | -  | -  | -  | 3  |
| Nước ép chanh                                                | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Nước                                                         | 10 | 10 | 10 | 10 |

*Lưu ý (1): Tinh bột sắn được cải biến hóa học: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột sắn chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý.*

Nước cốt trái cây thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả nước cốt trái cây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 9-1 và 9-2, trong đó bổ sung bất kỳ một trong số các tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 và 10-2, có khả năng duy trì hình dạng và hình khối tốt, và có sự kết dính tốt bên trên thực phẩm như món tráng miệng, và có cảm giác tạo thành sợi và độ dính ít hơn, và kết cấu trơn mịn. Mặt khác, nước cốt trái cây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 9-1 có tính chất vật lý giống như gel và kết cấu nặng, và còn có sự tan kém trong miệng và không có độ trơn mịn. Nước cốt trái cây của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 9-2 có khả năng duy trì hình dạng kém và hình khối kém, và gây ra sự nhỏ giọt vì sự kết dính kém bên trên thực phẩm như món tráng miệng, và còn có kết cấu với độ dính, và sự tan kém trong miệng.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 10: Sản xuất nước cốt

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 19 dưới đây, đường trắng mềm và mẫu tinh bột đã được trộn trước ở trạng thái bột được bổ sung vào nước, và được gia nhiệt có khuấy ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút. Dầm đã

được ủ, muối thông thường, nước ép chanh, và gia vị bao gồm mononatri glutamat và các chất tương tự được bổ sung và được gia nhiệt thêm có khuấy trong 5 phút. Sau khi làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng, lòng đỏ trứng được bổ sung vào đó và được trộn kĩ. Bằng cách sử dụng thiết bị trộn đồng nhất do Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd. sản xuất (hiện nay có tên là: PRIMIX Corporation), dầu salad được bổ sung từ từ từng giọt trong khi trộn có khuấy ở tốc độ 8000 vòng/phút. Sau khi bổ sung từng giọt toàn bộ lượng dầu salad, hỗn hợp được trộn có khuấy ở tốc độ 8000 vòng/phút tiếp trong 5 phút để sản xuất nước xốt.

Bảng 19

| Chế phẩm (các phần)                                              | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 10-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 10-2 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 10-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 10-2 |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Dầu salat                                                        | 38                                     | 38                                     | 38                             | 38                             |
| Dấm đã được ủ (độ axit: 4,2)                                     | 10                                     | 10                                     | 10                             | 10                             |
| Lòng đỏ trứng                                                    | 5                                      | 5                                      | 5                              | 5                              |
| Đường trắng mềm                                                  | 5                                      | 5                                      | 5                              | 5                              |
| Muối thông thường                                                | 3                                      | 3                                      | 3                              | 3                              |
| Nước ép chanh                                                    | 2                                      | 2                                      | 2                              | 2                              |
| Tinh bột sắn chưa được cải biến hóa học <small>Lưu ý (2)</small> | 2,5                                    | -                                      | -                              | -                              |
| Tinh bột sắn được cải biến hóa học <small>Lưu ý (1)</small>      | -                                      | 2,5                                    | -                              | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9                             | -                                      | -                                      | 2,5                            | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 10-2                          | -                                      | -                                      | -                              | 2,5                            |
| Mononatri glutamat                                               | 0,2                                    | 0,2                                    | 0,2                            | 0,2                            |
| Hạt tiêu                                                         | lượng thích hợp                        | lượng thích hợp                        | lượng thích hợp                | lượng thích hợp                |
| Mù tạc                                                           | lượng thích hợp                        | lượng thích hợp                        | lượng thích hợp                | lượng thích hợp                |
| Nước                                                             | 33,8                                   | 33,8                                   | 33,8                           | 33,8                           |

*Lưu ý (1): Tinh bột sắn được cải biến hóa học: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột sắn chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý.*

Nước xốt thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả nước xốt của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 10-1 và 10-2, trong đó bổ sung mỗi tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 và 10-2, có khả năng duy trì hình dạng tốt và hình khối tốt, và dường như ít nhỏ giọt hơn vì sự kết dính tốt bên trên rau và các tính chất tương tự, và gây ra cảm giác tạo thành sợi và độ dính ít hơn, và có kết cấu tròn mịn. Mặt khác, nước xốt của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 10-1 có tính chất vật lý giống như gel và kết cấu nặng, và còn có sự tan kém trong miệng và không có độ tròn mịn. Ngoài ra, nước xốt của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so

sánh 10-2 có khả năng duy trì hình dạng kém và hình khối kém và gây ra sự nhỏ giọt vì sự kết dính kém bên trên rau và các tính chất tương tự, và còn có kết cấu với độ dính, và sự tan kém trong miệng.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 11: Sản xuất bột nhào làm bánh cho thực phẩm chiên rán ngập dầu

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 20 dưới đây, bột mì mềm và mẫu tinh bột đã được trộn trước ở trạng thái bột được tạo huyền phù trong nước lạnh và được trộn kỹ để điều chế bột nhào làm bánh cho thực phẩm chiên rán ngập dầu.

Bảng 20

| Chế phẩm<br>(các phần)                                          | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 11-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 11-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>11-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm<br>11-2 |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Bột mì mềm                                                      | 150                                             | 95                                              | 95                                      | 95                                      |
| Tinh bột sẵn chưa được<br>cải biến hóa học <sup>Lưu ý (2)</sup> | 30                                              | -                                               | -                                       | -                                       |
| Tinh bột sẵn được cải<br>biến hóa học <sup>Lưu ý (1)</sup>      | -                                               | 30                                              | -                                       | -                                       |
| Tinh bột được điều chế<br>trong Ví dụ 9                         | -                                               | -                                               | 30                                      | -                                       |
| Tinh bột được điều chế<br>trong Ví dụ 10-2                      | -                                               | -                                               | -                                       | 30                                      |
| nước lạnh                                                       | 230                                             | 230                                             | 230                                     | 230                                     |

*Lưu ý (1): Tinh bột sẵn được cải biến hóa học: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Tinh bột sẵn chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sẵn tự nhiên chưa qua xử lý.*

Bột nhào làm bánh thu được cho thực phẩm chiên rán ngập dầu thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả món tempura thu được bằng cách nhúng các thành phần như tôm trong bột nhào làm bánh cho thực phẩm chiên rán ngập dầu của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 11-1 và 11-2, trong đó bổ sung tinh bột được điều

chế trong Ví dụ 9 hoặc 10-2, nhờ đó bao các thành phần bằng bột nhão làm bánh, và chiên trong dầu, hoặc thực phẩm chiên rán thu được bằng cách nhúng các thành phần như tôm trong bột nhão làm bánh cho thực phẩm chiên rán ngập dầu của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 11-1 và 11-2, trong đó tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 hoặc 10-2 được bổ sung, nhờ đó bao các thành phần bằng bột nhão làm bánh, bao tiếp nó với ruột bánh mì và chiên trong dầu, có kết cấu giòn và nhẹ. Mặt khác, món tempura và thực phẩm chiên rán, trong đó bột nhão làm bánh cho thực phẩm chiên rán ngập dầu của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 11-1 và Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 11-2 được sử dụng, có kết cấu kém giòn, và hầu như không làm cho người sử dụng cảm thấy độ nhẹ.

#### Ví dụ sản xuất thử nghiệm 12: Sản xuất xúc xích

Trong số các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 21 dưới đây, thịt nạc vai của lợn được đặt trong máy cắt tĩnh, trong khi cắt thịt này ở tốc độ cao, casein natri, muối thông thường, đường trắng mềm, gia vị, dung dịch nước dằm, bột thịt lợn, gia vị, kali sorbat, chất điều chỉnh độ pH và chất màu thực phẩm được bổ sung và được trộn kỹ. Khi hỗn hợp được tạo thành bột nhão, nước với nước đá và mỡ lợn được bổ sung và tiếp tục cắt. Cuối cùng, mẫu tinh bột được bổ sung vào đó và được trộn kỹ để thu được bột nhão đồng nhất. Bột nhão này được đổ vào khuôn và sau đó được tiệt trùng ở nhiệt độ 80°C trong 40 phút để sản xuất xúc xích bằng cách làm nguội bằng nước máy.

Bảng 21

| Chế phẩm<br>(các phần) | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 12-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 12-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 12-1 | Ví dụ sản xuất<br>thử nghiệm<br>12-2 |
|------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Thịt nạc vai của lợn   | 60                                              | 60                                              | 60                                   | 60                                   |
| Mỡ lợn                 | 10                                              | 10                                              | 10                                   | 10                                   |



|                                                              |                 |                 |                 |                 |
|--------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Cazein natri                                                 | 1               | 1               | 1               | 1               |
| Tinh bột sản chưa được cải biến hóa học <sup>Lưu ý (3)</sup> | 3               | -               | -               | -               |
| Tinh bột sản được cải biến hóa học <sup>Lưu ý (1)</sup>      | -               | 3               | -               | -               |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9                         | -               | -               | 3               | -               |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 10-2                      | -               | -               | -               | 3               |
| Nước với nước đá                                             | 25              | 25              | 25              | 25              |
| Muối thông thường                                            | 1,4             | 1,4             | 1,4             | 1,4             |
| Đường trắng mềm                                              | 1               | 1               | 1               | 1               |
| Gia vị                                                       | 0,3             | 0,3             | 0,3             | 0,3             |
| Dung dịch nước dấm                                           | 0,5             | 0,5             | 0,5             | 0,5             |
| Bột thịt lợn                                                 | 1               | 1               | 1               | 1               |
| Gia vị                                                       | 0,5             | 0,5             | 0,5             | 0,5             |
| Kali sorbat                                                  | 0,15            | 0,15            | 0,15            | 0,15            |
| Chất điều chỉnh độ pH                                        | 0,15            | 0,15            | 0,15            | 0,15            |
| Chất màu Creation RC <sup>Lưu ý (2)</sup>                    | lượng thích hợp | lượng thích hợp | lượng thích hợp | lượng thích hợp |

*Lưu ý (1): Tinh bột sản được cải biến hóa học: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (2): Chất màu Creation RC: Chất màu thực phẩm cánh kiến nhỏ. "Creation" là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.*

*Lưu ý (3): Tinh bột sản chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý.*

Vào ngày sản xuất tiếp theo và sau một tuần, xúc xích thu được được cho qua thử nghiệm cảm quan. Xúc xích của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 12-1 có kết cấu với độ dẻo kém không đáng kể và không có khả năng nhai tốt. Xúc xích của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 12-2 có độ cứng nhưng có kết cấu cứng, và sự phân giải của tinh bột xảy ra trong thử nghiệm cảm quan sau khi làm lạnh trong một tuần, và do đó xúc xích thể hiện kết cấu khô và nhặt nhẻo với sự phân tách nước. So với xúc xích của các Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh này, cả xúc xích của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 12-1 và 12-2, trong đó

bổ sung tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9 hoặc 10-2, có độ dẻo với khả năng nhai tốt và cũng gây ra ít sự thay đổi theo thời gian hơn.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 13: Sản xuất udon thô

, nước để nhào thu được bằng cách hòa tan 2 phần muối thông thường trong 40 phần nước được bổ sung vào hỗn hợp bột thu được bằng cách trộn tinh bột, bột mì trung bình và gluten dạng bột theo tỷ lệ sau đây theo chế phẩm được thể hiện trong Bảng 22 dưới đây, sau đó là nhào trong thiết bị trộn chân không trong 12 phút. Bằng cách sử dụng thiết bị sản xuất mì sợi, hỗn hợp đã được nhào thu được được trộn và cán để thu được sợi mì sợi, sợi này được cắt bằng cách sử dụng răng cắt số 10 để thu được udon thô.

Bảng 22

| Chế phẩm<br>(các phần)                                                 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 13-1 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 13-2 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm so<br>sánh 13-3 | Ví dụ sản<br>xuất thử<br>nghiệm 13-<br>1 |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Bột mì                                                                 | 80                                              | 80                                              | 80                                              | 80                                       |
| Tinh bột sản<br>chưa được cải<br>biến hóa học <sup>Lưu<br/>ý (3)</sup> | 20                                              | -                                               | -                                               | -                                        |
| Tinh bột sản<br>được cải biến<br>hóa học 1 <sup>Lưu ý<br/>(1)</sup>    | -                                               | 20                                              | -                                               | -                                        |
| Tinh bột sản<br>được cải biến<br>hóa học 2 <sup>Lưu ý (2)</sup>        | -                                               | -                                               | 20                                              | -                                        |
| Tinh bột được<br>điều chế trong<br>Ví dụ 10-2                          | -                                               | -                                               | -                                               | 20                                       |
| Gluten dạng bột                                                        | 2                                               | 2                                               | 2                                               | 2                                        |
| Muối                                                                   | 2                                               | 2                                               | 2                                               | 2                                        |
| Nước                                                                   | 40                                              | 40                                              | 40                                              | 40                                       |

*Lưu ý (1): Tinh bột sản được cải biến hóa học 1: "CHEMISTAR 280", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất "CHEMISTAR" là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.*

*Lưu ý (2): Tinh bột sản được cải biến hóa học 2: "RK-08", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất*

*Lưu ý (3): Tinh bột sản chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sản tự nhiên chưa qua xử lý.*

Udon thô thu được được luộc trong nước sôi trong 10 phút và được nhúng trong súp nóng, và sau đó kết cấu được đánh giá. Udon của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 13-1 và Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 13-2 kém về độ dẻo và kết cấu hầu như không được cải thiện. Đối với udon của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 13-3, nhận thấy tác dụng tạo ra độ dẻo là không đáng kể. Tuy nhiên, chỉ có độ cứng rắn được tạo ra và tác dụng này có thể có tác động xấu trên mì sợi. Mặt khác, đối với udon của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 13-1, nhận thấy tác dụng tạo kết cấu dính với khả năng nhai tuyệt vời.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 14: Sản xuất kẹo thạch

Theo chế phẩm được thể hiện trong Bảng 23 dưới đây, đường trắng, xi-rô tinh bột, tinh bột và nước được trộn có khuấy theo tỷ lệ sau, hỗn hợp được hoà tan bằng cách gia nhiệt đến Bx (Brix) 75. Dung dịch thu được được đổ vào khuôn, và được để ở nhiệt độ bình thường trong 24 giờ. Sau khi xác nhận rằng dung dịch đã được hóa rắn, nó được lấy ra khỏi khuôn để thu được kẹo thạch.

Bảng 23

| Chế phẩm (các phần)                                         | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 14-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 14-2 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 14-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 14-2 |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Đường                                                       | 34                                     | 34                                     | 34                             | 34                             |
| Xi-rô tinh bột                                              | 30                                     | 30                                     | 30                             | 30                             |
| Tinh bột sẵn chưa được cải biến hóa học<br><i>Lưu ý (2)</i> | 21                                     | -                                      | -                              | -                              |
| Tinh bột sẵn được cải biến hóa học<br><i>Lưu ý (1)</i>      | -                                      | 21                                     | -                              | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9                        | -                                      | -                                      | 21                             | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 10-2                     | -                                      | -                                      | -                              | 21                             |
| Nước                                                        | 15                                     | 15                                     | 15                             | 15                             |

*Lưu ý (1): Tinh bột sẵn được cải biến hóa học: "CHEMISTAR 300S" do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất "CHEMISTAR" là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO., LTD.*

*Lưu ý (2): Tinh bột sẵn chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sẵn tự nhiên chưa qua xử lý.*

Kẹo thạch thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả kẹo thạch của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 14-1 và 14-2 đều có độ nhót đàn hồi thích hợp và kết cấu tan tốt trong miệng. Mặt khác, kẹo thạch của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 14-1 có cảm giác đàn hồi mạnh, và kẹo thạch của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 14-2 có kết cấu dính mạnh, nhưng cả hai kẹo thạch này đều có

cảm giác rất nhão và sự tan kém trong miệng.

Ví dụ sản xuất thử nghiệm 15: Sản xuất món tráng miệng đã được làm đông lạnh

Theo chế phẩm được thể hiện trong Bảng 24 dưới đây, trong khi nguyên liệu thô và nước được trộn có khuấy theo tỷ lệ sau, hỗn hợp được hoà tan bằng cách gia nhiệt đến Bx (Brix) 40. Dung dịch thu được được đặt trong máy làm kem và được làm nguội có khuấy trong 35 phút. Nguyên liệu thu được được chuyển vào đồ chứa và sau đó được làm đông lạnh để thu được món tráng miệng đã được làm đông lạnh.

Bảng 24

| Chế phẩm (các phần)                                                 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 15-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 15-2 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 15-1 | Ví dụ sản xuất thử nghiệm 15-2 |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Xi-rô tinh bột                                                      | 18                                     | 18                                     | 18                             | 18                             |
| Đường hạt                                                           | 12                                     | 12                                     | 12                             | 12                             |
| Kem tươi                                                            | 12                                     | 12                                     | 12                             | 12                             |
| Dầu và chất béo thực vật                                            | 6                                      | 6                                      | 6                              | 6                              |
| Tinh bột sắn chưa được cải biến hóa học<br><small>Lưu ý (2)</small> | 2,4                                    | -                                      | -                              | -                              |
| Tinh bột sắn được cải biến hóa học<br><small>Lưu ý (1)</small>      | -                                      | 2,4                                    | -                              | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 9                                | -                                      | -                                      | 2,4                            | -                              |
| Tinh bột được điều chế trong Ví dụ 10-2                             | -                                      | -                                      | -                              | 2,4                            |
| Gôm guar                                                            | 0,4                                    | 0,4                                    | 0,4                            | 0,4                            |
| Chất nhũ hóa                                                        | 0,2                                    | 0,2                                    | 0,2                            | 0,2                            |
| Nước                                                                | 49                                     | 49                                     | 49                             | 49                             |

*Lưu ý (1): Tinh bột sắn được cải biến hóa học: "CHEMISTAR 300S", do GLICO FOODS CO., LTD. sản xuất "CHEMISTAR" là nhãn hiệu đã được đăng ký của GLICO FOODS CO.,*

LTD.

*Lưu ý (2): Tinh bột sẵn chưa được cải biến hóa học: Tinh bột sẵn tự nhiên chưa qua xử lý.*

Món tráng miệng được làm đông lạnh thu được thể hiện các kết quả sau. Đó là, cả hai món tráng miệng được làm đông lạnh của Ví dụ sản xuất thử nghiệm 15-1 và 15-2 đều có độ nhớt đàn hồi thích hợp và kết cấu dính, và có kết cấu tan tốt trong miệng. Mặt khác, món tráng miệng được làm đông lạnh của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 15-1 có kết cấu dính và món tráng miệng được làm đông lạnh của Ví dụ sản xuất thử nghiệm so sánh 15-2 còn có kết cấu dính và khả năng kéo sợi được. Tuy nhiên, cả hai món tráng miệng được làm đông lạnh này đều có cảm giác rất nhão và sự tan kém trong miệng.

#### Ví dụ 13-1

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) xyclodextrin glucanotransferaza ("Toruzyme 3,0L" thu được từ *Bacillus licheniformis*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2. Do đó, độ nhớt cuối cùng của nó là 7,0 (BU).

#### Ví dụ 13-2

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột lúa mì tự nhiên



chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 6,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) xyclodextrin glucanotransferaza (Cyclodextrin cycrodextrin glucanotransferase “Amano” thu được từ *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*), do Amano Enzyme sản xuất) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần của dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2-2.

#### Ví dụ 14

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) xyclodextrin glucanotransferaza (“Toruzyme 3,0L” thu được từ *Bacillus licheniformis*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần của dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3-2. Do đó, độ nhớt cuối cùng của nó là 0 (BU).

## Ví dụ 15

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) xyclodextrin glucanotransferaza (“Toruzyme 3,0L” thu được từ *Bacillus licheniformis*, do Novo sản xuất; độ pH tối ưu bằng 6,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần của dung dịch phản ứng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4-2. Theo đó, độ nhớt cuối cùng của nó là 2 (BU).

## Ví dụ so sánh 18

750 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 6,7% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 8,5, bổ sung 7,36 g monome vinyl axetat và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 40 phút để cho phép phản ứng diễn ra. Sau 40 phút, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột axetat được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột axetat thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

## Ví dụ so sánh 19

785 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 11% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 24 g propylen oxit và khuấy ở nhiệt độ 42°C trong 16 giờ để cho phép phản ứng diễn ra. Sau 16 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột hydroxypropyl được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột hydroxypropyl thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

## Ví dụ so sánh 20

750 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 6,7% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 10  $\mu$ l phospho oxyclorua và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ để cho phép phản ứng diễn ra. Sau 1 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột kép phosphat được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột kép phosphat thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

## Ví dụ so sánh 21

910 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 10% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 16 g

propylen oxit và khuấy ở nhiệt độ 42°C trong 16 giờ để cho phép phản ứng este hóa diễn ra. Sau 16 giờ, nhiệt độ của huyền phù tinh bột được điều chỉnh đến 30°C, 5 µl phospho oxyclorea được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ để thực hiện phản ứng liên kết ngang. Sau 1 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và toàn bộ phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột kép hydroxypropyl phosphat được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột kép hydroxypropyl phosphat thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

#### Ví dụ 16

9 kg nước trao đổi ion được bổ sung vào 4 kg tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza ("OPTIDEX L-400" thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Lưu ý rằng tỷ lệ phân giải của mẫu thu được là 21 %.

#### Ví dụ 17

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột axetat được điều chế trong Ví dụ so sánh 18 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza ("OPTIDEX L-400" thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở

nhệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 18

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột axetat điều chế được trong Ví dụ so sánh 18 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 19

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột hydroxypropyl được điều chế trong Ví dụ so sánh 19 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và

khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 20

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột hydroxypropyl điều chế được trong Ví dụ so sánh 19 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 21

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột kép phosphat điều chế được trong Ví dụ so sánh 20 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và



khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 22

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột kép phosphat được điều chế trong Ví dụ so sánh 20 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 23

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột kép hydroxypropyl phosphat điều chế được trong Ví dụ so sánh 21 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ

pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 24

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột kép hydroxypropyl phosphat điều chế được trong Ví dụ so sánh 21 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza ("AMYLEX A3" thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 25

750 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 6,7% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 16 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 8,5, bổ sung 7,36 g monome vinyl axetat và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 40 phút để thực hiện phản ứng. Sau 40 phút, độ pH của huyền phù được điều

chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym axit axetic được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym axit axetic thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 26

785 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 11% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 16 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 24 g propylen oxit và khuấy ở nhiệt độ 42°C trong 16 giờ để thực hiện phản ứng. Sau 16 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột hydroxypropyl đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột hydroxypropyl đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 27

750 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 6,7% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 16 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 10 µl phospho oxychlorua và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ để thực hiện phản ứng. Sau 1 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh

đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột kép phosphat được xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột kép phosphat được xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phản dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 28

910 g dung dịch nước natri sulfat có nồng độ 10% (theo khối lượng) được bổ sung vào 500 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 16 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 16 g propylen oxit và khuấy ở nhiệt độ 42°C trong 16 giờ để thực hiện phản ứng ete hóa. Sau 16 giờ, nhiệt độ của huyền phù tinh bột được điều chỉnh đến 30°C và 5 µl phospho oxyclorea được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ để thực hiện phản ứng liên kết ngang. Sau 1 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và toàn bộ phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột kép hydroxypropyl phosphat được xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột kép hydroxypropyl phosphat đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phản dung dịch phản ứng.

Kết quả xác định của Ví dụ so sánh từ 18 đến 21 và Ví dụ từ 17 đến 28 được thể hiện trong Bảng 25-2. Lưu ý rằng trong phân tích bằng lưu biến kế của tinh bột theo sáng chế mà có sử dụng kết hợp cải biến hóa học và xử lý enzym, thì sau khi bảo quản lạnh ở nhiệt độ 5°C trong 16 giờ, gel không có độ

cứng đủ để xác định. Do vậy, khó so sánh tính chất vật lý của các gel này. Do vậy, việc xác nhận được tiến hành sau khi bảo quản lạnh ở nhiệt độ 5°C trong 21 ngày. Chi tiết là như sau.

Hồ tinh bột được điều chế sao cho hàm lượng tinh bột là 20% khối lượng tính theo chất khô, và sau đó được đổ vào hộp Krehalon có độ dày cuộn gấp là 45 mm. Hồ tinh bột được đổ vào hộp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C ở tốc độ 1°C/phút và được giữ ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút. Sau đó, hồ tinh bột được để nguội trong bể nước có nhiệt độ không đổi ở nhiệt độ 20°C trong 30 phút, và sau đó nó được làm lạnh xuống 5°C trong tủ lạnh. Sau khi làm nguội, nó được làm lạnh ở nhiệt độ 5°C trong 21 ngày, sau đó nó được để ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) trong 4 giờ để nhiệt độ của nó quay trở lại nhiệt độ trong phòng, và sau đó việc xác định được tiến hành bằng lưu biến kế (RT-2010J-CW) do Rheotech Inc sản xuất. Việc xác định được tiến hành trong điều kiện xác định của lưu biến kế: mục thử nghiệm: thử nghiệm kéo đứt; chiều cao của mẫu: 25 mm; và tốc độ chuyển động (tốc độ gãy) của mẫu: 6 cm/phút, sử dụng bộ thích ứng của gá hình cầu để xác định độ nhót  $\phi 5$  (đường kính: 5 mm, diện tích: 19,635 mm<sup>2</sup>). Tại thời điểm xác định, độ cứng của gel tinh bột được đánh giá bởi ứng suất gãy (g) và mô đun Young (dyn/cm<sup>2</sup>).

Bảng 25-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng trong phương pháp kết hợp cải biến hóa học và xử lý enzym

| Ví dụ            | Tên của enzym     | Nguồn gốc                | Loại cải biến hóa học                     |
|------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------------------------|
| Ví dụ so sánh 18 | -                 | -                        | Axetyl hóa                                |
| Ví dụ 17         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Axetyl hóa                                |
| Ví dụ 18         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | Axetyl hóa                                |
| Ví dụ 25         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Axetyl hóa                                |
| Ví dụ so sánh 19 | -                 | -                        | Hydroxypropyl hóa                         |
| Ví dụ 19         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa                         |
| Ví dụ 20         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa                         |
| Ví dụ 26         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa                         |
| Ví dụ so sánh 20 | -                 | -                        | Liên kết ngang phosphat                   |
| Ví dụ 21         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Liên kết ngang phosphat                   |
| Ví dụ 22         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | Liên kết ngang phosphat                   |
| Ví dụ 27         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Liên kết ngang phosphat                   |
| Ví dụ so sánh 21 | -                 | -                        | Hydroxypropyl hóa liên kết ngang phosphat |
| Ví dụ 23         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa liên kết ngang phosphat |
| Ví dụ 24         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa liên kết ngang phosphat |
| Ví dụ 28         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Hydroxypropyl hóa liên kết ngang phosphat |
| Ví dụ so sánh 22 | -                 | -                        | Tinh bột oxy hóa                          |
| Ví dụ 29         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | Tinh bột oxy hóa                          |
| Ví dụ 30         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | Tinh bột oxy hóa                          |
| Ví dụ so sánh 23 | -                 | -                        | (Tinh bột được tẩy trắng)                 |
| Ví dụ 31         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | (Tinh bột được tẩy trắng)                 |
| Ví dụ 32         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | (Tinh bột được tẩy trắng)                 |



Bảng 25-2: Tóm tắt việc sử dụng kết hợp cải biến hóa học và xử lý enzym (Hàm lượng tinh bột đối với phương pháp amylograph: 6,0%)

| Ví dụ            | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ứng suất gây        |                 | Mô đun Young                           |                 |
|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|
|                  |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Giá trị đo được (g) | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |
| Ví dụ so sánh 18 | -                   | 895                  | 100             | 606                   | 121                 | 100             | 2.499.026                              | 100             |
| Ví dụ 17         | 7                   | 727                  | 81              | 433                   | 145                 | 120             | 2.923.860                              | 117             |
| Ví dụ 18         | 9                   | 693                  | 77              | 429                   | 142                 | 117             | 3.023.821                              | 121             |
| Ví dụ 25         | 21                  | 797                  | 89              | 472                   | 215                 | 178             | 4.169.554                              | 167             |
| Ví dụ so sánh 19 | -                   | 1004                 | 100             | 670                   | 33                  | 100             | 373.715                                | 100             |
| Ví dụ 19         | 20                  | 845                  | 84              | 550                   | 47                  | 142             | 483.149                                | 129             |
| Ví dụ 20         | 21                  | 661                  | 66              | 470                   | 43                  | 130             | 669.986                                | 179             |
| Ví dụ 26         | 21                  | 824                  | 82              | 525                   | 71                  | 215             | 573.625                                | 153             |
| Ví dụ so sánh 20 | -                   | 903                  | 100             | 0                     | 170                 | 100             | 3.943.691                              | 100             |
| Ví dụ 21         | 21                  | 908                  | 101             | 0                     | 283                 | 166             | 5.319.388                              | 135             |
| Ví dụ 22         | 15                  | 871                  | 96              | 0                     | 337                 | 198             | 7.529.620                              | 191             |
| Ví dụ 27         | 21                  | 898                  | 99              | 0                     | 554                 | 326             | 10.027.924                             | 254             |
| Ví dụ so sánh 21 | -                   | 769                  | 100             | 403                   | 31                  | 100             | 250.328                                | 100             |
| Ví dụ 23         | 19                  | 740                  | 96              | 413                   | 45                  | 145             | 391.117                                | 156             |
| Ví dụ 24         | 21                  | 524                  | 68              | 356                   | 64                  | 206             | 1.218.285                              | 487             |
| Ví dụ 28         | 21                  | 784                  | 102             | 207                   | 125                 | 403             | 1.497.293                              | 598             |
| Ví dụ so sánh 22 | -                   | 317                  | 100             | 227                   | 91                  | 100             | 4.468.130                              | 100             |
| Ví dụ 29         | 7                   | 419                  | 132             | 324                   | 119                 | 131             | 5.953.997                              | 133             |
| Ví dụ 30         | 9                   | 411                  | 130             | 315                   | 101                 | 111             | 5.048.987                              | 113             |
| Ví dụ so sánh 23 | -                   | 715                  | 100             | 181                   | 137                 | 100             | 4.494.603                              | 100             |
| Ví dụ 31         | 22                  | 673                  | 94              | 138                   | 224                 | 164             | 5.293.378                              | 118             |
| Ví dụ 32         | 31                  | 630                  | 88              | 143                   | 237                 | 173             | 6.764.052                              | 150             |

\* Mỗi tỷ lệ phân giải trong Ví dụ 25 đến 28 được dùng để chỉ tỷ lệ phân giải của tinh bột đã xử lý bằng enzym được sử dụng làm nguyên liệu nền.

Đã xác nhận rằng khi sử dụng kết hợp việc cải biến hóa học và xử lý enzym, đặc biệt là khi tinh bột kép phosphat được xử lý bằng enzym, thì khả năng tạo gel có thể được tăng cường trong khi vẫn giữ được độ nhớt tối đa. Điều này là ưu điểm cực kỳ tuyệt vời so với thực tế là khi liên kết ngang phosphat tăng trong phương pháp cải biến hóa học thông thường, gel trở nên cứng hơn nhưng độ nhớt tối đa giảm mạnh, do đó gây ra sự tạo bột. Cũng được xác nhận đối với không chỉ tinh bột kép phosphat mà còn với tinh bột được cải biến hóa học khác rằng, bằng cách thực hiện việc xử lý enzym, có thể tăng cường khả năng tạo gel trong khi duy trì một cách tương đối độ nhớt so với tinh bột được cải biến hóa học thông thường.

#### Ví dụ so sánh 22: Tinh bột oxy hóa

750 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 10,0, bổ sung 2,5 g natri hypoclorit mà lượng clo hữu hiệu của nó là 10% và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ để thực hiện phản ứng, trong khi vẫn giữ nguyên độ pH của huyền phù ở 10,0. Sau 2 giờ, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và sau đó 2 g natri hydro sulfite được bổ sung. Ngay sau khi khuấy, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột oxy hóa được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột oxy hóa thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

#### Ví dụ so sánh 23: Tinh bột được tẩy trắng

700 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 500 g tinh bột sắn tự nhiên

chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 11,0, bổ sung 2,5 g natri hypoclorit mà lượng clo hữu hiệu của nó là 10% và khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 5 phút trong khi vẫn giữ nguyên độ pH của huyền phù ở 11. Sau đó, 0,25 g natri metabisulfit được bổ sung và được khuấy trong 10 phút, độ pH của huyền phù được điều chỉnh đến 6,0 và phản ứng được kết thúc. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột được tẩy trắng được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã tẩy trắng thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế.

Ví dụ 29: Trường hợp tinh bột oxy hóa được xử lý bằng amyloglucosidaza

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột oxy hóa được điều chế trong Ví dụ so sánh 22 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza ("OPTIDEX L-400" thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

Ví dụ 30: Trường hợp tinh bột oxy hóa được xử lý bằng  $\alpha$ -amylaza

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột oxy hóa được

điều chế trong Ví dụ so sánh 22 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

Ví dụ 31: Trường hợp tinh bột được tẩy trắng được xử lý bằng amyloglucosidaza

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột được tẩy trắng được điều chế trong Ví dụ so sánh 23 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

Ví dụ 32: Trong trường hợp tinh bột được tẩy trắng được xử lý bằng  $\alpha$ -amylaza

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột được tẩy trắng được điều chế trong Ví dụ so sánh 23 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả xác định của Ví dụ so sánh từ 22 đến 23 và Ví dụ từ 29 đến 32 được thể hiện trong Bảng 25-2.

#### Ví dụ so sánh 24

Nước trao đổi ion được bổ sung vào 2 kg tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý, nhờ đó điều chỉnh hàm lượng nước đến 21%. Sản phẩm thu được được đổ vào cốc có mỏ thủy tinh có dung tích 3L ở trạng thái trong đó khoảng trống càng nhỏ càng tốt, và phần phía trên được đậy bằng lá nhôm, và sau đó được gia nhiệt ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút để thực hiện xử lý nhiệt-hơi ẩm. Sau khi hoàn thành xử lý nhiệt-hơi ẩm, tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm được thu hồi bằng cách làm khô bằng gió thổi.

#### Ví dụ 33

9 kg nước trao đổi ion được bổ sung vào 4 kg tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh

bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Lưu ý rằng tỷ lệ phân giải của mẫu thu được là 34%.

#### Ví dụ 34

9 kg nước trao đổi ion được bổ sung vào 4 kg tinh bột ngô tự nhiên chưa qua xử lý để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza (“AMYLEX A3” thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Lưu ý rằng tỷ lệ phân giải của mẫu thu được là 28 %.

#### Ví dụ 35

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm được điều chế trong Ví dụ so sánh 24 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột) amyloglucosidaza (“OPTIDEX L-400” thu được từ *Aspergillus niger*, do Genencor sản xuất; độ pH tối ưu bằng 4,4) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột được xử lý bằng enzym-nhiệt-hơi ẩm được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym-nhiệt-hơi ẩm thu được được



phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 36

900 g nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm được điều chế trong Ví dụ so sánh 24 để điều chế huyền phù tinh bột. Sau khi điều chỉnh độ pH của huyền phù đến 5,0, bổ sung 1% khối lượng (tính theo hàm lượng chất rắn của tinh bột)  $\alpha$ -amylaza ("AMYLEX A3" thu được từ *Aspergillus niger*, do DANISCO sản xuất; độ pH tối ưu bằng 5,0) và khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 18 giờ để thực hiện phản ứng enzym. Sau khi hoàn thành phản ứng, tinh bột đã xử lý bằng enzym-nhiệt-hơi ẩm được thu hồi bằng cách lọc ly tâm và làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng enzym-nhiệt-hơi ẩm thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng cách sử dụng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 37

Nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 33, nhờ đó điều chỉnh hàm lượng nước đến 21%. Sản phẩm thu được được đổ vào cốc có mỏ thủy tinh có dung tích 1L ở trạng thái trong đó khoảng trống càng nhỏ càng tốt, và phần phía trên được đậy bằng lá nhôm, và sau đó được gia nhiệt ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút để thực hiện xử lý nhiệt-hơi ẩm. Sau khi hoàn thành xử lý nhiệt-hơi ẩm, tinh bột đã xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm-enzym được thu hồi bằng cách làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm-enzym thu được

được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng.

#### Ví dụ 38

Nước trao đổi ion được bổ sung vào 400 g tinh bột đã xử lý bằng enzym được điều chế trong Ví dụ 34 nhờ đó điều chỉnh hàm lượng nước đến 20%. Sản phẩm thu được được đổ vào cốc có mỏ thủy tinh có dung tích 1L ở trạng thái trong đó khoảng trống càng nhỏ càng tốt, và phần phía trên được đẩy bằng lá nhôm, và sau đó được gia nhiệt ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút để thực hiện xử lý nhiệt-hơi ẩm. Sau khi hoàn thành xử lý nhiệt-hơi ẩm, tinh bột được xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm-enzym được thu hồi bằng cách làm khô bằng gió thổi. Các đặc tính độ nhớt của tinh bột đã xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm-enzym thu được được phân tích bằng phương pháp amylograph và lưu biến kế. Ngoài ra, sau khi hoàn thành phản ứng, tỷ lệ phân giải được xác định bằng một phần dung dịch phản ứng. Kết quả xác định của Ví dụ so sánh 24 và Ví dụ từ 35 đến 38 được thể hiện trong Bảng 26-2.

Bảng 26-1: Tóm tắt tên, nguồn gốc và tên sản phẩm của enzym được sử dụng để xử lý tinh bột đã xử lý bằng nhiệt-hơi ẩm

| Ví dụ            | Tên của enzym     | Nguồn gốc                | Tên sản phẩm của enzym (nhà sản xuất) |
|------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Ví dụ so sánh 24 | -                 | -                        | Tinh bột ngô chưa qua xử lý           |
| Ví dụ 35         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | OPTIDEX L-400 (Genencor)              |
| Ví dụ 36         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | AMYLEX A3 (DANISCO)                   |
| Ví dụ 37         | amyloglucosidaza  | <i>Aspergillus niger</i> | OPTIDEX L-400 (Genencor)              |
| Ví dụ 38         | $\alpha$ -amylaza | <i>Aspergillus niger</i> | AMYLEX A3 (DANISCO)                   |

Bảng 26-2

| Ví dụ            | Tỷ lệ phân giải (%) | Độ nhớt tối đa       |                 | Độ nhớt phân hủy (BU) | Ngày tiếp theo      |                 |                                        |                 |
|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|
|                  |                     | Giá trị đo được (BU) | % tương đối (%) |                       | Ứng suất gãy        |                 | Môđun Young                            |                 |
|                  |                     |                      |                 |                       | Giá trị đo được (g) | % tương đối (%) | Giá trị đo được (dyn/cm <sup>2</sup> ) | % tương đối (%) |
| Ví dụ so sánh 24 | -                   | 401                  | 100             | 108                   | 230                 | 100             | 6.091.460                              | 100             |
| Ví dụ 35         | 39                  | 351                  | 88              | 96                    | 439                 | 191             | 6.566.419                              | 108             |
| Ví dụ 36         | 33                  | 351                  | 88              | 91                    | 436                 | 190             | 6.788.705                              | 111             |
| Ví dụ 37         | 34                  | 327                  | 82              | 74                    | 420                 | 182             | 6.690.934                              | 110             |
| Ví dụ 38         | 28                  | 349                  | 87              | 79                    | 428                 | 186             | 7.132.581                              | 117             |

\* Mỗi tỷ lệ phân giải trong Ví dụ 37 và 38 dùng để chỉ tỷ lệ phân giải của tinh bột đã xử lý bằng enzym được sử dụng làm nguyên liệu nền.

Như nêu trên, sáng chế được minh họa bằng cách sử dụng phương án được ưu tiên của sáng chế, nhưng sáng chế không được hiểu là bị giới hạn ở phương án này. Cần phải hiểu rằng phạm vi của sáng chế chỉ bị giới hạn ở các điểm yêu cầu bảo hộ. Cần phải hiểu rằng người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện phạm vi tương đương dựa trên phần mô tả của sáng chế và kiến thức kỹ thuật chung, từ phần mô tả phương án ưu tiên cụ thể của sáng chế. Cần phải hiểu rằng các patent, đơn yêu cầu cấp patent và các tài liệu công bố trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

#### Khả năng áp dụng công nghiệp

Như nêu trên, sáng chế tạo ra nhiều ưu điểm về mặt công nghiệp bằng cách sử dụng enzym có các đặc tính là có khả năng làm tăng độ nhớt tối đa của tinh bột.

Theo sáng chế, có thể tạo ra thực phẩm có kết cấu mới mà không thể thu được bởi tinh bột thông thường chưa được cải biến hóa học và tinh bột được cải biến hóa học. Ví dụ, việc sử dụng tinh bột sẵn đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể tạo ra bánh quy rất nhẹ và mềm và có kết cấu với khả năng tan tốt trong miệng, và tạo ra bánh quy có kết cấu dễ ăn mà cũng thích hợp đối với người cao tuổi và trẻ em. Ngoài ra, vì bột nhào tại thời điểm tạo hình bánh quy là rất khô và không dính, nên lượng nước bổ sung tại thời điểm điều chế bột nhào có thể được tăng tiếp, do đó có thể tăng yếu tố hiệu suất. Ngoài ra, đối với thực phẩm như bánh tinh bột sẵn dây được gọi như vậy trong vùng Kanto, mà trước đây cần thời gian dài và tốn nhân công vì việc điều chế tinh bột lúa mì làm nguyên liệu thô đòi hỏi quy trình lên men trong một thời gian dài như một hoặc nhiều năm, thì việc sử dụng tinh bột lúa mì đã xử lý bằng enzym theo sáng chế có thể dễ dàng tạo ra bánh tinh bột sẵn dây được gọi như vậy trong

vùng Kanto mà không có mùi lên men do tinh bột lúa mì được lên men và có hương vị thơm ngon, mà không cần thời gian dài và tốn nhiều nhân công như vậy.

Ngoài ra, khi tinh bột sắn được xử lý bằng enzym theo sáng chế được sử dụng trong mì sợi, ví dụ, udon thô, nhận thấy tác dụng cải thiện kết cấu bằng cách làm giảm kết cấu dính cùng với khả năng nhai tốt, và không gây ra ảnh hưởng bất lợi đến các yếu tố chất lượng của mì sợi, như “trơn và mịn” và “ướt”. Như vậy, đã phát hiện ra rằng việc bổ sung tinh bột đã xử lý bằng enzym này cải thiện một cách dễ dàng kết cấu của mì sợi được ưa thích bởi người Nhật Bản.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột, phương pháp này bao gồm các bước:

xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C, để thu được các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel được cải thiện;

loại bỏ hydrat cacbon được tạo ra bởi sự thủy phân bằng enzym ra khỏi các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym;

trộn nguyên liệu thực phẩm, các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp;

gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và

làm nguội hỗn hợp chứa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa, nhờ đó gel hóa các hạt tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột, trong đó:

enzym nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm  $\alpha$ -amylaza thu được từ *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus niger*; amyloglucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus* hoặc *Rhizopus oryzae*;  $\alpha$ -glucosidaza thu được từ *Aspergillus niger*; isoamylaza thu được từ *Flavobacterium* sp. hoặc *Pseudomonas amyloclavata* và cyclodextrin glucanotransferaza thu được từ *Bacillus licheniformis* hoặc *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*), với điều kiện hạt tinh bột nêu trên không phải là hạt tinh bột của tinh bột có hàm lượng amyloza cao chứa 30% amyloza hoặc nhiều hơn.

2. Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột, phương pháp này bao gồm các bước:



xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C, để thu được các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel được cải thiện;

loại bỏ hydrat cacbon được tạo ra bởi sự thủy phân bằng enzym ra khỏi các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym;

trộn nguyên liệu thực phẩm, các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp;

gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và

làm nguội hỗn hợp chứa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa, nhờ đó gel hóa các hạt tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột, trong đó (1) enzym được mã hóa bởi phân tử axit nucleic có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 hoặc 9, và có hoạt tính thủy phân tinh bột;

trong đó điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện lai hóa trong dung dịch chứa formamit 50%, 5 X SSC có thành phần NaCl 750 mM, trisnatri xitrat 75 mM, natri phosphat 50 mM có độ pH = 7,6, 5 X dung dịch Denhardt có thành phần BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2% và polyvinylpyrrolidon 0,2%, dextran sulfat 10% và ADN tinh trùng cá hồi 20 µg/ml được cắt biến tính ở nhiệt độ 65°C, và sau đó rửa trong điều kiện nhiệt độ 65°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC có nồng độ gấp 0,1 đến 2 lần, thành phần của dung dịch SSC có nồng độ gấp 1 lần là natri clorua 150 mM và natri xitrat 15 mM, với điều kiện hạt tinh bột nêu trên không phải là hạt tinh bột của tinh bột có hàm lượng amyloza cao chứa 30% amyloza hoặc nhiều hơn.

3. Phương pháp sản xuất thực phẩm chứa gel tinh bột, phương pháp này bao

gồm các bước:

xử lý các hạt tinh bột bằng enzym ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 70°C, để thu được các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có khả năng tạo gel được cải thiện;

loại bỏ hydrat cacbon được tạo ra bởi sự thủy phân bằng enzym ra khỏi các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym;

trộn nguyên liệu thực phẩm, các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym và nước để thu được hỗn hợp;

gia nhiệt hỗn hợp này nhờ đó gelatin hóa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym trong hỗn hợp; và

làm nguội hỗn hợp chứa các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym đã được gelatin hóa nhờ đó gel hóa các hạt tinh bột để thu được thực phẩm chứa gel tinh bột, trong đó:

(1) enzym có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 hoặc 10, và có hoạt tính thủy phân tinh bột, với điều kiện hạt tinh bột nêu trên không phải là hạt tinh bột của tinh bột có hàm lượng amyloza cao chứa 30% amyloza hoặc nhiều hơn.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, và các hạt tinh bột này không được cải biến hóa học và cũng không được xử lý vật lý ở giai đoạn bất kỳ cho đến khi thu được thực phẩm chứa gel tinh bột bằng phương pháp này.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của

tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột đã xử lý vật lý, phương pháp này còn bao gồm bước cải biến hóa học tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được cải biến hóa học này được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý vật lý tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được xử lý vật lý này được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.

8. Thực phẩm chứa gel tinh bột được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 1.

9. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm cao và lượng ẩm của thực phẩm này là lớn hơn 40 g và nhỏ hơn 95 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

10. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước sốt cay và nước sốt, và mì sợi.

11. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm thấp và lượng ẩm của thực phẩm này nằm trong khoảng từ 1 g đến 40 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.

12. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm thực phẩm được nướng, bánh kẹo kiểu phương Tây, và thực phẩm chiên rán.

13. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó tinh bột thu được từ cây sắn, ngô hoặc cây lúa mì.

14. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học.
15. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, và các hạt tinh bột này không được cải biến hóa học cũng không được xử lý vật lý ở giai đoạn bất kỳ cho đến khi thu được thực phẩm chứa gel tinh bột bằng phương pháp này.
16. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột đã xử lý vật lý, phương pháp này còn bao gồm bước cải biến hóa học tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được cải biến hóa học được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.
17. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý vật lý tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được xử lý vật lý này được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.
18. Thực phẩm chứa gel tinh bột được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 2.
19. Thực phẩm theo điểm 18, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm cao và lượng ẩm của thực phẩm này là lớn hơn 40 g và nhỏ hơn 95 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.
20. Thực phẩm theo điểm 18, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước sốt cay và nước sốt, và mì sợi.

21. Thực phẩm theo điểm 18, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm thấp và lượng ẩm của thực phẩm này nằm trong khoảng từ 1 g đến 40 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.
22. Thực phẩm theo điểm 18, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm thực phẩm được nướng, bánh kẹo kiểu phương Tây, và thực phẩm chiên rán.
23. Thực phẩm theo điểm 18, trong đó tinh bột thu được từ cây sắn, ngô hoặc cây lúa mì.
24. Phương pháp theo điểm 3, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, tinh bột đã xử lý vật lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học.
25. Phương pháp theo điểm 3, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý, và các hạt tinh bột này không được cải biến hóa học cũng không được xử lý vật lý ở giai đoạn bất kỳ cho đến khi thu được thực phẩm chứa gel tinh bột bằng phương pháp này.
26. Phương pháp theo điểm 3, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột đã xử lý vật lý, phương pháp này còn bao gồm bước cải biến hóa học tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được cải biến hóa học này được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.
27. Phương pháp theo điểm 3, trong đó các hạt tinh bột là các hạt tinh bột của tinh bột chưa qua xử lý hoặc tinh bột được cải biến hóa học, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý vật lý tinh bột đã xử lý bằng enzym, và tinh bột đã xử lý bằng enzym được xử lý vật lý này được trộn với nguyên liệu thực phẩm và nước.
28. Thực phẩm chứa gel tinh bột được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 3.

29. Thực phẩm theo điểm 28, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm cao và lượng ẩm của thực phẩm này là lớn hơn 40 g và nhỏ hơn 95 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.
30. Thực phẩm theo điểm 28, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm bánh kẹo kiểu Nhật truyền thống, thực phẩm chứa chất béo hoặc dầu, thực phẩm chứa gelatin, thực phẩm chế biến từ thịt cá và thịt động vật, nước xốt cay và nước xốt, và mì sợi.
31. Thực phẩm theo điểm 28, trong đó thực phẩm này là thực phẩm có hàm ẩm thấp và lượng hơi ẩm của thực phẩm này nằm trong khoảng từ 1 g đến 40 g cho mỗi 100 g khẩu phần ăn.
32. Thực phẩm theo điểm 28, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm thực phẩm được nướng, bánh kẹo kiểu phương Tây, và thực phẩm chiên rán.
33. Thực phẩm theo điểm 28, trong đó tinh bột thu được từ cây sắn, ngô hoặc cây lúa mì.
34. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của các hạt tinh bột trước khi xử lý bằng enzym khi được xác định bởi lưu biến kế.
35. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của các hạt tinh bột trước khi xử lý bằng enzym khi được xác định bởi lưu biến kế.
36. Phương pháp theo điểm 3, trong đó các hạt tinh bột đã xử lý bằng enzym có thể tạo gel có ứng suất gãy cao hơn ứng suất gãy của các hạt tinh bột trước khi xử lý bằng enzym khi được xác định bởi lưu biến kế.



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GLICO FOODS CO., LTD.  
 <120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC PHẨM CHỨA GEL TINH BỘT VÀ THỰC PHẨM CHỨA GEL TINH BỘT ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY  
 <130> GF001PCT  
 <140> PCT/JP2010/005046  
 <141> 2010-08-11  
 <150> JP 2009-189567  
 <151> 2009-08-18  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.4  
 <210> 1  
 <211> 1848  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus oryzae*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1848)  
 <400> 1  
 atg cct tcc aag gtc aca cag tat ctg acc ggt gtt cca cac acc gac 48  
 Met Pro Ser Lys Val Thr Gln Tyr Leu Thr Gly Val Pro His Thr Asp  
 1 5 10 15  
 tgc ttg ggt acc gaa gca gtt gat acg tct att gaa gta gaa cgg cgc 96  
 Cys Leu Gly Thr Glu Ala Val Asp Thr Ser Ile Glu Val Glu Arg Arg  
 20 25 30  
 atg atg acg cat ccg tcc tat att tgg cta tac ctg tca gaa aat cag 144  
 Met Met Thr His Pro Ser Tyr Ile Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Asn Gln  
 35 40 45  
 ctt ttt ctt gtt ggg tat ttt cat cag ttt cac ttc gta gcc tct cat 192  
 Leu Phe Leu Val Gly Tyr Phe His Gln Phe His Phe Val Ala Ser His  
 50 55 60  
 agc ggc ttt ctt tct att caa gcc atc aat gtt acc cat tcc atc ctg 240  
 Ser Gly Phe Leu Ser Ile Gln Ala Ile Asn Val Thr His Ser Ile Leu  
 65 70 75 80  
 gtt tct ctt act tct cta ttc aca agc ggt cgg tct gtg gat act aaa 288  
 Val Ser Leu Thr Ser Leu Phe Thr Ser Gly Arg Ser Val Asp Thr Lys  
 85 90 95

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tac | gtg | gtt | aaa | ata | gaa | gag | gca | cag | cat | ctt | act | aaa | ctc | cca | tca | 336 |
| Tyr | Val | Val | Lys | Ile | Glu | Glu | Ala | Gln | His | Leu | Thr | Lys | Leu | Pro | Ser |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| tgg | gat | acc | cct | gac | aat | tcg | ctc | atg | cta | caa | ggc | ttt | gaa | tgg | cat | 384 |
| Trp | Asp | Thr | Pro | Asp | Asn | Ser | Leu | Met | Leu | Gln | Gly | Phe | Glu | Trp | His |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| gtt | cca | gat | gat | caa | ggg | cat | tgg | aaa | cgt | ctt | caa | cgc | tca | cta | gtg | 432 |
| Val | Pro | Asp | Asp | Gln | Gly | His | Trp | Lys | Arg | Leu | Gln | Arg | Ser | Leu | Val |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| agt | cta | aaa | tcg | att | ggc | gtc | gac | agt | att | tgg | att | cca | ccg | gga | tgt | 480 |
| Ser | Leu | Lys | Ser | Ile | Gly | Val | Asp | Ser | Ile | Trp | Ile | Pro | Pro | Gly | Cys |     |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| aaa | gca | atg | aac | cct | tcc | ggc | aat | ggc | tat | gac | atc | tat | gat | cta | tac | 528 |
| Lys | Ala | Met | Asn | Pro | Ser | Gly | Asn | Gly | Tyr | Asp | Ile | Tyr | Asp | Leu | Tyr |     |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |
| gac | cta | gga | gaa | ttc | gac | cag | aag | gga | tca | cga | tct | aca | aaa | tgg | ggc | 576 |
| Asp | Leu | Gly | Glu | Phe | Asp | Gln | Lys | Gly | Ser | Arg | Ser | Thr | Lys | Trp | Gly |     |
|     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| agc | aag | aca | gaa | ctc | caa | tca | cta | gct | tgc | tct | gcg | cgg | aat | ctc | ggg | 624 |
| Ser | Lys | Thr | Glu | Leu | Gln | Ser | Leu | Ala | Cys | Ser | Ala | Arg | Asn | Leu | Gly |     |
|     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
| att | ggc | att | tgc | tgg | gat | gca | gtt | ctt | aac | cac | aaa | gct | ggc | gcg | gat | 672 |
| Ile | Gly | Ile | Cys | Trp | Asp | Ala | Val | Leu | Asn | His | Lys | Ala | Gly | Ala | Asp |     |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| tat | aca | gaa | cgg | ttt | tcg | gct | gta | aaa | gtg | gac | cca | aaa | gac | cgc | agt | 720 |
| Tyr | Thr | Glu | Arg | Phe | Ser | Ala | Val | Lys | Val | Asp | Pro | Lys | Asp | Arg | Ser |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| gtt | gaa | atc | ttc | gct | gca | agg | gag | att | gaa | ggc | tgg | gtt | gga | ttc | agt | 768 |
| Val | Glu | Ile | Phe | Ala | Ala | Arg | Glu | Ile | Glu | Gly | Trp | Val | Gly | Phe | Ser |     |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |
| ttc | ccg | ggc | cgt | ggc | ggc | ata | tat | agt | tct | atg | aaa | tat | agc | tgg | cat | 816 |
| Phe | Pro | Gly | Arg | Gly | Gly | Ile | Tyr | Ser | Ser | Met | Lys | Tyr | Ser | Trp | His |     |
|     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| cat | ttc | agc | ggc | gtt | gac | tgg | gat | gaa | gct | cgg | aag | aaa | aat | gcg | ata | 864 |
| His | Phe | Ser | Gly | Val | Asp | Trp | Asp | Glu | Ala | Arg | Lys | Lys | Asn | Ala | Ile |     |
|     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
| tac | aga | gtt | gct | agc | aaa | cga | tgg | tct | gat | gat | gtg | gcc | cac | gag | aag | 912 |
| Tyr | Arg | Val | Ala | Ser | Lys | Arg | Trp | Ser | Asp | Asp | Val | Ala | His | Glu | Lys |     |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| gga | aac | tat | gac | tat | ctt | atg | ttc | gcc | gac | cta | gat | tat | tcc | aac | cta | 960 |
| Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Leu | Met | Phe | Ala | Asp | Leu | Asp | Tyr | Ser | Asn | Leu |     |

| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| gaa gtt cag aag gac gtt ctc cga tgg gga gaa tgg ata gga agc caa |     |     |     | 1008 |
| Glu Val Gln Lys Asp Val Leu Arg Trp Gly Glu Trp Ile Gly Ser Gln |     |     |     |      |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |      |
| tta cct ctc tgg ggt atg agg tta gat gca agc aaa cac tac tcg gct |     |     |     | 1056 |
| Leu Pro Leu Trp Gly Met Arg Leu Asp Ala Ser Lys His Tyr Ser Ala |     |     |     |      |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |      |
| gat ttc cag aag aaa ttt gtc aat cac gtt cga gca act gtc ggg ccg |     |     |     | 1104 |
| Asp Phe Gln Lys Lys Phe Val Asn His Val Arg Ala Thr Val Gly Pro |     |     |     |      |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |      |
| cag att ttc ttc gtt gca gag tat tgg agc ggc gat gtc agg gtt ctt |     |     |     | 1152 |
| Gln Ile Phe Phe Val Ala Glu Tyr Trp Ser Gly Asp Val Arg Val Leu |     |     |     |      |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |      |
| atg cat tac cta cag aag atg gat tac cag ctg tct ctg ttc gat gca |     |     |     | 1200 |
| Met His Tyr Leu Gln Lys Met Asp Tyr Gln Leu Ser Leu Phe Asp Ala |     |     |     |      |
|                                                                 | 385 | 390 | 395 | 400  |
| ccc tta gtc ggg cgc ttc tcg agg atc tcg cgc acg gga gaa gat ctt |     |     |     | 1248 |
| Pro Leu Val Gly Arg Phe Ser Arg Ile Ser Arg Thr Gly Glu Asp Leu |     |     |     |      |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |      |
| cgc gag atc ttc gat gat acg ctg gta ggg aac aag cct gca cac gca |     |     |     | 1296 |
| Arg Glu Ile Phe Asp Asp Thr Leu Val Gly Asn Lys Pro Ala His Ala |     |     |     |      |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |      |
| att act cta gtt atg aat cat gac acg gta aga gag aga cag tcc cta |     |     |     | 1344 |
| Ile Thr Leu Val Met Asn His Asp Thr Val Arg Glu Arg Gln Ser Leu |     |     |     |      |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |      |
| gag gct cca att gca tca ttc ttc aag cca ctc gcc tat gca tta att |     |     |     | 1392 |
| Glu Ala Pro Ile Ala Ser Phe Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Leu Ile |     |     |     |      |
|                                                                 | 450 | 455 | 460 |      |
| cta ctc cga gac aag ggg cag ccg tgt ata ttt tat gga gac ctt tac |     |     |     | 1440 |
| Leu Leu Arg Asp Lys Gly Gln Pro Cys Ile Phe Tyr Gly Asp Leu Tyr |     |     |     |      |
|                                                                 | 465 | 470 | 475 | 480  |
| ggt atc aga cgc ggc gtc aaa aat ccc atg act cca tcc tgt ggc gga |     |     |     | 1488 |
| Gly Ile Arg Arg Gly Val Lys Asn Pro Met Thr Pro Ser Cys Gly Gly |     |     |     |      |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |      |
| aag ctt cca gtt ctt gca cgg gct cgt aag ctt tat gct tac ggc gaa |     |     |     | 1536 |
| Lys Leu Pro Val Leu Ala Arg Ala Arg Lys Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu |     |     |     |      |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |      |
| caa tgc gac tat ttt gat caa gcc aat tgc atc gga ttc gtc cgt tat |     |     |     | 1584 |
| Gln Cys Asp Tyr Phe Asp Gln Ala Asn Cys Ile Gly Phe Val Arg Tyr |     |     |     |      |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |      |

ggc aac ttg cat cac ccg tcc ggt cta gca tgc atc atg agc aac ggg 1632  
 Gly Asn Leu His His Pro Ser Gly Leu Ala Cys Ile Met Ser Asn Gly  
     530                    535                    540

ggg ggc tct cag aaa cgt atg tac gtc gga cgg agc cat gcc aag gag 1680  
 Gly Ala Ser Gln Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Ser His Ala Lys Glu  
     545                    550                    555                    560

cga tgg aca gac att ttg ggg tgg cat cca aag aca gtt atc atc gat 1728  
 Arg Trp Thr Asp Ile Leu Gly Trp His Pro Lys Thr Val Ile Ile Asp  
                     565                    570                    575

aag aaa ggt tat ggg ata ttt cct gtt tct gca atg cag gtt agt gtc 1776  
 Lys Lys Gly Tyr Gly Ile Phe Pro Val Ser Ala Met Gln Val Ser Val  
                     580                    585                    590

tgg gtg aac tcg gcc gca gaa gcg aga gaa agt ctt caa gag cct ttc 1824  
 Trp Val Asn Ser Ala Ala Glu Ala Arg Glu Ser Leu Gln Glu Pro Phe  
                     595                    600                    605

gag gag aag att tac gag aat tga 1848  
 Glu Glu Lys Ile Tyr Glu Asn  
     610                    615

<210> 2  
 <211> 615  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae

<400> 2

Met Pro Ser Lys Val Thr Gln Tyr Leu Thr Gly Val Pro His Thr Asp  
 1                    5                    10                    15

Cys Leu Gly Thr Glu Ala Val Asp Thr Ser Ile Glu Val Glu Arg Arg  
                     20                    25                    30

Met Met Thr His Pro Ser Tyr Ile Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Asn Gln  
                     35                    40                    45

Leu Phe Leu Val Gly Tyr Phe His Gln Phe His Phe Val Ala Ser His  
     50                    55                    60

Ser Gly Phe Leu Ser Ile Gln Ala Ile Asn Val Thr His Ser Ile Leu  
 65                    70                    75                    80

Val Ser Leu Thr Ser Leu Phe Thr Ser Gly Arg Ser Val Asp Thr Lys  
                     85                    90                    95

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Asp | Thr | Pro | Asp | Asn | Ser | Leu | Met | Leu | Gln | Gly | Phe | Glu | Trp | His | 115 | 120 | 125 |
| Val | Pro | Asp | Asp | Gln | Gly | His | Trp | Lys | Arg | Leu | Gln | Arg | Ser | Leu | Val | 130 | 135 | 140 |
| Ser | Leu | Lys | Ser | Ile | Gly | Val | Asp | Ser | Ile | Trp | Ile | Pro | Pro | Gly | Cys | 145 | 150 | 155 |
| Lys | Ala | Met | Asn | Pro | Ser | Gly | Asn | Gly | Tyr | Asp | Ile | Tyr | Asp | Leu | Tyr | 165 | 170 | 175 |
| Asp | Leu | Gly | Glu | Phe | Asp | Gln | Lys | Gly | Ser | Arg | Ser | Thr | Lys | Trp | Gly | 180 | 185 | 190 |
| Ser | Lys | Thr | Glu | Leu | Gln | Ser | Leu | Ala | Cys | Ser | Ala | Arg | Asn | Leu | Gly | 195 | 200 | 205 |
| Ile | Gly | Ile | Cys | Trp | Asp | Ala | Val | Leu | Asn | His | Lys | Ala | Gly | Ala | Asp | 210 | 215 | 220 |
| Tyr | Thr | Glu | Arg | Phe | Ser | Ala | Val | Lys | Val | Asp | Pro | Lys | Asp | Arg | Ser | 225 | 230 | 235 |
| Val | Glu | Ile | Phe | Ala | Ala | Arg | Glu | Ile | Glu | Gly | Trp | Val | Gly | Phe | Ser | 245 | 250 | 255 |
| Phe | Pro | Gly | Arg | Gly | Gly | Ile | Tyr | Ser | Ser | Met | Lys | Tyr | Ser | Trp | His | 260 | 265 | 270 |
| His | Phe | Ser | Gly | Val | Asp | Trp | Asp | Glu | Ala | Arg | Lys | Lys | Asn | Ala | Ile | 275 | 280 | 285 |
| Tyr | Arg | Val | Ala | Ser | Lys | Arg | Trp | Ser | Asp | Asp | Val | Ala | His | Glu | Lys | 290 | 295 | 300 |
| Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Leu | Met | Phe | Ala | Asp | Leu | Asp | Tyr | Ser | Asn | Leu | 305 | 310 | 315 |
| Glu | Val | Gln | Lys | Asp | Val | Leu | Arg | Trp | Gly | Glu | Trp | Ile | Gly | Ser | Gln | 325 | 330 | 335 |
| Leu | Pro | Leu | Trp | Gly | Met | Arg | Leu | Asp | Ala | Ser | Lys | His | Tyr | Ser | Ala | 340 | 345 | 350 |
| Asp | Phe | Gln | Lys | Lys | Phe | Val | Asn | His | Val | Arg | Ala | Thr | Val | Gly | Pro | 355 | 360 | 365 |
| Gln | Ile | Phe | Phe | Val | Ala | Glu | Tyr | Trp | Ser | Gly | Asp | Val | Arg | Val | Leu | 370 | 375 | 380 |
| Met | His | Tyr | Leu | Gln | Lys | Met | Asp | Tyr | Gln | Leu | Ser | Leu | Phe | Asp | Ala | 385 | 390 | 395 |

Pro Leu Val Gly Arg Phe Ser Arg Ile Ser Arg Thr Gly Glu Asp Leu  
                             405                            410                            415  
 Arg Glu Ile Phe Asp Asp Thr Leu Val Gly Asn Lys Pro Ala His Ala  
                             420                            425                            430  
 Ile Thr Leu Val Met Asn His Asp Thr Val Arg Glu Arg Gln Ser Leu  
                             435                            440                            445  
 Glu Ala Pro Ile Ala Ser Phe Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Leu Ile  
                             450                            455                            460  
 Leu Leu Arg Asp Lys Gly Gln Pro Cys Ile Phe Tyr Gly Asp Leu Tyr  
 465                            470                            475                            480  
 Gly Ile Arg Arg Gly Val Lys Asn Pro Met Thr Pro Ser Cys Gly Gly  
                             485                            490                            495  
 Lys Leu Pro Val Leu Ala Arg Ala Arg Lys Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu  
                             500                            505                            510  
 Gln Cys Asp Tyr Phe Asp Gln Ala Asn Cys Ile Gly Phe Val Arg Tyr  
                             515                            520                            525  
 Gly Asn Leu His His Pro Ser Gly Leu Ala Cys Ile Met Ser Asn Gly  
                             530                            535                            540  
 Gly Ala Ser Gln Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Ser His Ala Lys Glu  
 545                            550                            555                            560  
 Arg Trp Thr Asp Ile Leu Gly Trp His Pro Lys Thr Val Ile Ile Asp  
                             565                            570                            575  
 Lys Lys Gly Tyr Gly Ile Phe Pro Val Ser Ala Met Gln Val Ser Val  
                             580                            585                            590  
 Trp Val Asn Ser Ala Ala Glu Ala Arg Glu Ser Leu Gln Glu Pro Phe  
                             595                            600                            605  
 Glu Glu Lys Ile Tyr Glu Asn  
                             610                            615

<210> 3  
 <211> 1497  
 <212> ADN  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1497)

<400> 3  
 atg gtc gcg tgg tgg tct cta ttt ctg tac ggc ctt cag gtc gcg gca



|          |     |     |     |          |     |     |     |     |           |     |     |     |     |           |     |  |     |
|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|--|-----|
| Met<br>1 | Val | Ala | Trp | Trp<br>5 | Ser | Leu | Phe | Leu | Tyr<br>10 | Gly | Leu | Gln | Val | Ala<br>15 | Ala |  |     |
| cct      | gct | ttg | gct | gca      | acg | cct | gcg | gac | tgg       | cga | tcg | caa | tcc | att       | tat |  | 96  |
| Pro      | Ala | Leu | Ala | Ala      | Thr | Pro | Ala | Asp | Trp       | Arg | Ser | Gln | Ser | Ile       | Tyr |  |     |
|          |     |     | 20  |          |     |     |     | 25  |           |     |     |     | 30  |           |     |  |     |
| ttc      | ctt | ctc | acg | gat      | cga | ttt | gca | agg | acg       | gat | ggg | tcg | acg | act       | gcg |  | 144 |
| Phe      | Leu | Leu | Thr | Asp      | Arg | Phe | Ala | Arg | Thr       | Asp | Gly | Ser | Thr | Thr       | Ala |  |     |
|          |     | 35  |     |          |     |     | 40  |     |           |     |     | 45  |     |           |     |  |     |
| act      | tgt | aat | act | gcg      | gat | cag | aaa | tac | tgt       | ggt | gga | aca | tgg | cag       | ggc |  | 192 |
| Thr      | Cys | Asn | Thr | Ala      | Asp | Gln | Lys | Tyr | Cys       | Gly | Gly | Thr | Trp | Gln       | Gly |  |     |
|          | 50  |     |     |          |     | 55  |     |     |           |     | 60  |     |     |           |     |  |     |
| atc      | atc | gac | aag | ttg      | gac | tat | atc | cag | gga       | atg | ggc | ttc | aca | gcc       | atc |  | 240 |
| Ile      | Ile | Asp | Lys | Leu      | Asp | Tyr | Ile | Gln | Gly       | Met | Gly | Phe | Thr | Ala       | Ile |  |     |
| 65       |     |     |     |          | 70  |     |     |     |           | 75  |     |     |     |           | 80  |  |     |
| tgg      | atc | acc | ccc | gtt      | aca | gcc | cag | ctg | ccc       | cag | acc | acc | gca | tat       | gga |  | 288 |
| Trp      | Ile | Thr | Pro | Val      | Thr | Ala | Gln | Leu | Pro       | Gln | Thr | Thr | Ala | Tyr       | Gly |  |     |
|          |     |     |     | 85       |     |     |     |     | 90        |     |     |     |     | 95        |     |  |     |
| gat      | gcc | tac | cat | ggc      | tac | tgg | cag | cag | gat       | ata | tac | tct | ctg | aac       | gaa |  | 336 |
| Asp      | Ala | Tyr | His | Gly      | Tyr | Trp | Gln | Gln | Asp       | Ile | Tyr | Ser | Leu | Asn       | Glu |  |     |
|          |     |     | 100 |          |     |     |     | 105 |           |     |     |     | 110 |           |     |  |     |
| aac      | tac | ggc | act | gca      | gat | gac | ttg | aag | gcg       | ctc | tct | tcg | gcc | ctt       | cat |  | 384 |
| Asn      | Tyr | Gly | Thr | Ala      | Asp | Asp | Leu | Lys | Ala       | Leu | Ser | Ser | Ala | Leu       | His |  |     |
|          |     | 115 |     |          |     |     | 120 |     |           |     |     | 125 |     |           |     |  |     |
| gag      | agg | ggg | atg | tat      | ctt | atg | gtc | gat | gtg       | gtt | gct | aac | cat | atg       | ggc |  | 432 |
| Glu      | Arg | Gly | Met | Tyr      | Leu | Met | Val | Asp | Val       | Val | Ala | Asn | His | Met       | Gly |  |     |
|          | 130 |     |     |          |     | 135 |     |     |           |     | 140 |     |     |           |     |  |     |
| tat      | gat | gga | gcg | ggt      | agc | tca | gtc | gat | tac       | agt | gtg | ttt | aaa | ccg       | ttc |  | 480 |
| Tyr      | Asp | Gly | Ala | Gly      | Ser | Ser | Val | Asp | Tyr       | Ser | Val | Phe | Lys | Pro       | Phe |  |     |
| 145      |     |     |     |          | 150 |     |     |     |           | 155 |     |     |     |           | 160 |  |     |
| agt      | tcc | caa | gac | tac      | ttc | cac | ccg | ttc | tgt       | ttc | att | caa | aac | tat       | gaa |  | 528 |
| Ser      | Ser | Gln | Asp | Tyr      | Phe | His | Pro | Phe | Cys       | Phe | Ile | Gln | Asn | Tyr       | Glu |  |     |
|          |     |     |     | 165      |     |     |     |     | 170       |     |     |     |     | 175       |     |  |     |
| gat      | cag | act | cag | gtt      | gag | gat | tgc | tgg | cta       | gga | gat | aac | act | gtc       | tcc |  | 576 |
| Asp      | Gln | Thr | Gln | Val      | Glu | Asp | Cys | Trp | Leu       | Gly | Asp | Asn | Thr | Val       | Ser |  |     |
|          |     |     | 180 |          |     |     |     | 185 |           |     |     |     | 190 |           |     |  |     |
| ttg      | cct | gat | ctc | gat      | acc | acc | aag | gat | gtg       | gtc | aag | aat | gaa | tgg       | tac |  | 624 |
| Leu      | Pro | Asp | Leu | Asp      | Thr | Thr | Lys | Asp | Val       | Val | Lys | Asn | Glu | Trp       | Tyr |  |     |
|          |     | 195 |     |          |     |     | 200 |     |           |     |     | 205 |     |           |     |  |     |
| gac      | tgg | gtg | gga | tca      | ttg | gta | tcg | aac | tac       | tcc | att | gac | ggc | ctc       | cgt |  | 672 |
| Asp      | Trp | Val | Gly | Ser      | Leu | Val | Ser | Asn | Tyr       | Ser | Ile | Asp | Gly | Leu       | Arg |  |     |
|          | 210 |     |     |          |     | 215 |     |     |           |     | 220 |     |     |           |     |  |     |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| atc gac aca gta aaa cac gtc cag aag gac ttc tgg ccc ggg tac aac<br>Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn<br>225 230 235 240 | 720  |
| aaa gcc gca ggc gtg tac tgt atc ggc gag gtg ctc gac ggt gat ccg<br>Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp Pro<br>245 250 255     | 768  |
| gcc tac act tgt ccc tac cag aac gtc atg gac ggc gta ctg aac tat<br>Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr<br>260 265 270     | 816  |
| ccc att tac tat cca ctc ctc aac gcc ttc aag tca acc tcc ggc agc<br>Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser<br>275 280 285     | 864  |
| atg gac gac ctc tac aac atg atc aac acc gtc aaa tcc gac tgt cca<br>Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro<br>290 295 300     | 912  |
| gac tca aca ctc ctg ggc aca ttc gtc gag aac cac gac aac cca cgg<br>Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg<br>305 310 315 320 | 960  |
| ttc gct tct tac acc aac gac ata gcc ctc gcc aag aac gtc gca gca<br>Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala<br>325 330 335     | 1008 |
| ttc atc atc ctc aac gac gga atc ccc atc atc tac gcc ggc caa gaa<br>Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu<br>340 345 350     | 1056 |
| cag cac tac gcc ggc gga aac gac ccc gcg aac cgc gaa gca acc tgg<br>Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp<br>355 360 365     | 1104 |
| ctc tcg ggc tac ccg acc gac agc gag ctg tac aag tta att gcc tcc<br>Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser<br>370 375 380     | 1152 |
| gcg aac gca atc cgg aac tat gcc att agc aaa gat aca gga ttc gtg<br>Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val<br>385 390 395 400 | 1200 |
| acc tac aag aac tgg ccc atc tac aaa gac gac aca acg atc gcc atg<br>Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala Met<br>405 410 415     | 1248 |
| cgc aag ggc aca gat ggg tcg cag atc gtg act atc ttg tcc aac aag<br>Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn Lys<br>420 425 430     | 1296 |
| ggg gct tcg ggt gat tcg tat acc ctc tcc ttg agt ggt gcg ggt tac                                                                                       | 1344 |

Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr  
 435 440 445  
 aca gcc ggc cag caa ttg acg gag gtc att ggc tgc acg acc gtg acg 1392  
 Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr  
 450 455 460  
 gtt ggt tcg gat gga aat gtg cct gtt cct atg gca ggt ggg cta cct 1440  
 Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro  
 465 470 475 480  
 agg gta ttg tat ccg act gag aag ttg gca ggt agc aag atc tgt agt 1488  
 Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser  
 485 490 495  
 agc tcg tga 1497  
 Ser Ser  
 <210> 4  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger  
 <400> 4  
 Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Gln Val Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr  
 20 25 30  
 Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr Ala  
 35 40 45  
 Thr Cys Asn Thr Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly  
 50 55 60  
 Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr Gly  
 85 90 95  
 Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn Glu  
 100 105 110  
 Asn Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu His  
 115 120 125  
 Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly  
 130 135 140

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

Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr  
           435                                  440                                  445

Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr  
           450                                  455                                  460

Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro  
   465                                  470                                  475                                  480

Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser  
                                   485                                  490                                  495

Ser Ser

<210> 5  
 <211> 1923  
 <212> ADN  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1923)

<400> 5  
 atg tcg ttc cga tct cta ctc gcc ctg agc ggc ctc gtc tgc aca ggg 48  
 Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly  
 1                  5                                  10                                  15

ttg gca aat gtg att tcc aag cgc gcg acc ttg gat tca tgg ttg agc 96  
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser  
                   20                                  25                                  30

aac gaa gcg acc gtg gct cgt act gcc atc ctg aat aac atc ggg gcg 144  
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala  
                   35                                  40                                  45

gac ggt gct tgg gtg tcg ggc gcg gac tct ggc att gtc gtt gct agt 192  
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser  
           50                                  55                                  60

ccc agc acg gat aac ccg gac tac ttc tac acc tgg act cgc gac tct 240  
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser  
 65                                  70                                  75                                  80

ggt ctc gtc ctc aag acc ctc gtc gat ctc ttc cga aat gga gat acc 288  
 Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr  
                   85                                  90                                  95

agt ctc ctc tcc acc att gag aac tac atc tcc gcc cag gca att gtc 336  
 Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val  
                   100                                  105                                  110

cag ggt atc agt aac ccc tct ggt gat ctg tcc agc ggc gct ggt ctc 384

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



|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| aac ggc aac ccg tgg ttc ctg tgc acc ttg gct gcc gca gag cag ttg | 1056 |
| Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| tac gat gct cta tac cag tgg gac aag cag ggg tcg ttg gag gtc aca | 1104 |
| Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| gat gtg tcg ctg gac ttc ttc aag gca ctg tac agc gat gct gct act | 1152 |
| Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| ggc acc tac tct tcg tcc agt tcg act tat agt agc att gta gat gcc | 1200 |
| Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala     |      |
| 385 390 395 400                                                 |      |
| gtg aag act ttc gcc gat ggc ttc gtc tct att gtg gaa act cac gcc | 1248 |
| Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala |      |
| 405 410 415                                                     |      |
| gca agc aac ggc tcc atg tcc gag caa tac gac aag tct gat ggc gag | 1296 |
| Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu |      |
| 420 425 430                                                     |      |
| cag ctt tcc gct cgc gac ctg acc tgg tct tat gct gct ctg ctg acc | 1344 |
| Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr |      |
| 435 440 445                                                     |      |
| gcc aac aac cgt cgt aac tcc gtc gtg cct gct tct tgg ggc gag acc | 1392 |
| Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr |      |
| 450 455 460                                                     |      |
| tct gcc agc agc gtg ccc ggc acc tgt gcg gcc aca tct gcc att ggt | 1440 |
| Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly |      |
| 465 470 475 480                                                 |      |
| acc tac agc agt gtg act gtc acc tcg tgg ccg agt atc gtg gct act | 1488 |
| Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr |      |
| 485 490 495                                                     |      |
| ggc ggc acc act acg acg gct acc ccc act gga tcc ggc agc gtg acc | 1536 |
| Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr |      |
| 500 505 510                                                     |      |
| tcg acc agc aag acc acc gcg act gct agc aag acc agc acc agt acg | 1584 |
| Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr |      |
| 515 520 525                                                     |      |
| tca tca acc tcc tgt acc act ccc acc gcc gtg gct gtg act ttc gat | 1632 |
| Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp |      |
| 530 535 540                                                     |      |
| ctg aca gct acc acc acc tac ggc gag aac atc tac ctg gtc gga tcg | 1680 |

Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser  
 545 550 555 560  
 atc tct cag ctg ggt gac tgg gaa acc agc gac ggc ata gct ctg agt 1728  
 Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser  
 565 570 575  
 gct gac aag tac act tcc agc gac ccg ctc tgg tat gtc act gtg act 1776  
 Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr  
 580 585 590  
 ctg ccg gct ggt gag tcg ttt gag tac aag ttt atc cgc att gag agc 1824  
 Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser  
 595 600 605  
 gat gac tcc gtg gag tgg gag agt gat ccc aac cga gaa tac acc gtt 1872  
 Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val  
 610 615 620  
 cct cag gcg tgc gga acg tcg acc gcg acg gtg act gac acc tgg cgg 1920  
 Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg  
 625 630 635 640  
 tag 1923

<210> 6  
 <211> 640  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger

<400> 6

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser  
 20 25 30  
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser  
 50 55 60  
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr  
 85 90 95  
 Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val  
 100 105 110

Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu  
 115 120 125  
 Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp  
 130 135 140  
 Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr  
 165 170 175  
 Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln  
 180 185 190  
 Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser  
 195 200 205  
 Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser  
 210 215 220  
 Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe  
 245 250 255  
 Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr  
 260 265 270  
 Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp  
 275 280 285  
 Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu  
 290 295 300  
 Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr  
 325 330 335  
 Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu  
 340 345 350  
 Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr  
 355 360 365  
 Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr  
 370 375 380  
 Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala  
 385 390 395 400

Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala  
 405 410 415  
 Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu  
 420 425 430  
 Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr  
 435 440 445  
 Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr  
 450 455 460  
 Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly  
 465 470 475 480  
 Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr  
 485 490 495  
 Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr  
 500 505 510  
 Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr  
 515 520 525  
 Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp  
 530 535 540  
 Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser  
 565 570 575  
 Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr  
 580 585 590  
 Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser  
 595 600 605  
 Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val  
 610 615 620  
 Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg  
 625 630 635 640

<210> 7  
 <211> 2334  
 <212> ADN  
 <213> Flavobacterium sp.

<220>  
 <221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(2334)

&lt;400&gt; 7

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg gac cca cac gcc ccg cag cgg caa cga agc ggg cag cgc ttg cgc | 48  |
| Met Asp Pro His Ala Pro Gln Arg Gln Arg Ser Gly Gln Arg Leu Arg |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| gcc ctc gcc ctg gcc gcg ctg gcc tgc gcg ctg agc ccg gcc cac gcc | 96  |
| Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Cys Ala Leu Ser Pro Ala His Ala |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gcc atc gat gcg cag cag ctc ggc gcg cgc tac gac gcc gcc cag gcc | 144 |
| Ala Ile Asp Ala Gln Gln Leu Gly Ala Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Ala |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| aac ctc gcg ttc cgg gtc tat tcc tcg cgc gcg acc cgc gtc gag gtg | 192 |
| Asn Leu Ala Phe Arg Val Tyr Ser Ser Arg Ala Thr Arg Val Glu Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| ttc ctg tac aag aac ccg acc ggc tcg cag gaa gtc gcg cgg ctg gcg | 240 |
| Phe Leu Tyr Lys Asn Pro Thr Gly Ser Gln Glu Val Ala Arg Leu Ala |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ctg agc aag gac ccg gcg acc cag gtg tgg tcg ctg tcg ctg ccg acc | 288 |
| Leu Ser Lys Asp Pro Ala Thr Gln Val Trp Ser Leu Ser Leu Pro Thr |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| agc acg atc aag aac acc tac ggc atc acc ggc gcc gtc tac tac ggt | 336 |
| Ser Thr Ile Lys Asn Thr Tyr Gly Ile Thr Gly Ala Val Tyr Tyr Gly |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| tac cgc gcc tgg ggc ccg aac tgg ccc tac gat gcg gcc tgg acc aag | 384 |
| Tyr Arg Ala Trp Gly Pro Asn Trp Pro Tyr Asp Ala Ala Trp Thr Lys |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ggc agc gcc acc ggc ttc gtc agc gac gtc gac aac gcc ggc aac cgt | 432 |
| Gly Ser Ala Thr Gly Phe Val Ser Asp Val Asp Asn Ala Gly Asn Arg |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| ttc aat ccg aac aag ctg ctg ctc gac ccc tac gcg cgc gag atc agc | 480 |
| Phe Asn Pro Asn Lys Leu Leu Leu Asp Pro Tyr Ala Arg Glu Ile Ser |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| cag gac ccg aac acc gcg acc tgc gcc gac ggc acc atc tac gcc acc | 528 |
| Gln Asp Pro Asn Thr Ala Thr Cys Ala Asp Gly Thr Ile Tyr Ala Thr |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| ggc gcc gcg cac cgc aac aag gac agc ggc ctg tgc gcg agc aag ggc | 576 |
| Gly Ala Ala His Arg Asn Lys Asp Ser Gly Leu Cys Ala Ser Lys Gly |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| atc gcg ctg gcc gcg gac gcg acc tcg gtc ggc agc aag ccg acc cgc | 624 |
| Ile Ala Leu Ala Ala Asp Ala Thr Ser Val Gly Ser Lys Pro Thr Arg |     |
| 195 200 205                                                     |     |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gcg ctc aag gac gag gtg atc tac gaa gtg cac gtg cgc ggc ctg acc<br>Ala Leu Lys Asp Glu Val Ile Tyr Glu Val His Val Arg Gly Leu Thr<br>210 215 220     | 672  |
| cgc aac gac gac agc gtg ccc gcg gcc gaa cgc ggc acc tac aag ggc<br>Arg Asn Asp Asp Ser Val Pro Ala Ala Glu Arg Gly Thr Tyr Lys Gly<br>225 230 235 240 | 720  |
| gcc gcg cgc aag gcc gcc gcg ttg gcc gcg ctc ggc gtc acc gcg gtc<br>Ala Ala Arg Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Val Thr Ala Val<br>245 250 255     | 768  |
| gag ttc ctg ccg gtg cag gaa acc cag aac gac cag aac gat gtc gat<br>Glu Phe Leu Pro Val Gln Glu Thr Gln Asn Asp Gln Asn Asp Val Asp<br>260 265 270     | 816  |
| ccc aat tcc acc gcg ggc gac aac tac tgg ggc tac atg acc ctc aac<br>Pro Asn Ser Thr Ala Gly Asp Asn Tyr Trp Gly Tyr Met Thr Leu Asn<br>275 280 285     | 864  |
| tac ttc gcc ccg gac cgc cgc tac gcc tac gac aag tcg gcc ggc ggc<br>Tyr Phe Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Ser Ala Gly Gly<br>290 295 300     | 912  |
| ccg acc cgc gaa tgg aag gcg atg gtc aag gcc ttc cac gac gcc ggc<br>Pro Thr Arg Glu Trp Lys Ala Met Val Lys Ala Phe His Asp Ala Gly<br>305 310 315 320 | 960  |
| atc aag gtc tac atc gac gtg gtc tac aac cac acc ggc gaa ggc ggc<br>Ile Lys Val Tyr Ile Asp Val Val Tyr Asn His Thr Gly Glu Gly Gly<br>325 330 335     | 1008 |
| ccg tgg agc ggc acc gac ggg ctc agc gtc tac aac ctg ctc tcg ttc<br>Pro Trp Ser Gly Thr Asp Gly Leu Ser Val Tyr Asn Leu Leu Ser Phe<br>340 345 350     | 1056 |
| cgc ggc ctc gac aac ccg gcc tac tac tcg ctg agc agc gat tac aag<br>Arg Gly Leu Asp Asn Pro Ala Tyr Tyr Ser Leu Ser Ser Asp Tyr Lys<br>355 360 365     | 1104 |
| tat ccg tgg gac aac acc ggc gtc ggc ggc aac tac aac acc cgc cat<br>Tyr Pro Trp Asp Asn Thr Gly Val Gly Gly Asn Tyr Asn Thr Arg His<br>370 375 380     | 1152 |
| ccc atc gcc cag aac ctg atc gtc gac tcg ctg gcg tac tgg cgc gac<br>Pro Ile Ala Gln Asn Leu Ile Val Asp Ser Leu Ala Tyr Trp Arg Asp<br>385 390 395 400 | 1200 |
| gcg ctc ggc gta gac ggt ttc cgc ttc gat ctg gcc tcg gtg ctc ggc<br>Ala Leu Gly Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Val Leu Gly<br>405 410 415     | 1248 |
| aac agc tgc cag cac ggc tgc ttc aac ttc gac aag aac gac tcg ggc                                                                                       | 1296 |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Asn | Ser | Cys | Gln | His | Gly | Cys | Phe | Asn | Phe | Asp | Lys | Asn | Asp | Ser | Gly |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| aac | gcg | ctc | aac | cgc | atc | gtc | gcc | gag | ctg | ccg | ccg | cgc | ccg | gcc | gcg | 1344 |
| Asn | Ala | Leu | Asn | Arg | Ile | Val | Ala | Glu | Leu | Pro | Pro | Arg | Pro | Ala | Ala |      |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| ggc | ggc | gcc | ggc | gcg | gac | ctg | atc | gcc | gaa | ccc | tgg | gcg | atc | ggc | ggc | 1392 |
| Gly | Gly | Ala | Gly | Ala | Asp | Leu | Ile | Ala | Glu | Pro | Trp | Ala | Ile | Gly | Gly |      |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| aac | tcc | tac | cag | gtc | ggc | ggc | ttc | ccg | gcc | ggc | tgg | gcc | gag | tgg | aac | 1440 |
| Asn | Ser | Tyr | Gln | Val | Gly | Gly | Phe | Pro | Ala | Gly | Trp | Ala | Glu | Trp | Asn |      |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |
| ggc | ctc | tac | cgc | gac | gcg | ctg | cgc | aag | aag | cag | aac | aag | ctc | ggc | gtg | 1488 |
| Gly | Leu | Tyr | Arg | Asp | Ala | Leu | Arg | Lys | Lys | Gln | Asn | Lys | Leu | Gly | Val |      |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |      |
| gaa | acg | gtc | acc | ccc | ggc | acc | ctg | gcc | acg | cgc | ttc | gcc | ggc | tcc | aac | 1536 |
| Glu | Thr | Val | Thr | Pro | Gly | Thr | Leu | Ala | Thr | Arg | Phe | Ala | Gly | Ser | Asn |      |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |      |
| gac | ctg | tac | ggc | gac | gac | ggc | cgc | aag | ccg | tgg | cat | tcg | atc | aac | ttc | 1584 |
| Asp | Leu | Tyr | Gly | Asp | Asp | Gly | Arg | Lys | Pro | Trp | His | Ser | Ile | Asn | Phe |      |
|     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |
| gtg | gtc | gcc | cac | gac | ggc | ttc | acc | ctc | aac | gac | ctg | tac | gcc | tac | aac | 1632 |
| Val | Val | Ala | His | Asp | Gly | Phe | Thr | Leu | Asn | Asp | Leu | Tyr | Ala | Tyr | Asn |      |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |
| gac | aag | cag | aac | aac | cag | ccg | tgg | ccg | tac | ggg | ccg | tcc | gac | ggc | ggc | 1680 |
| Asp | Lys | Gln | Asn | Asn | Gln | Pro | Trp | Pro | Tyr | Gly | Pro | Ser | Asp | Gly | Gly |      |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |      |
| gag | gac | cac | aac | ctg | agc | tgg | aac | cag | ggc | ggc | atc | gtc | gcc | gag | cag | 1728 |
| Glu | Asp | His | Asn | Leu | Ser | Trp | Asn | Gln | Gly | Gly | Ile | Val | Ala | Glu | Gln |      |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |      |
| cgc | aag | gcc | gcg | cgc | acc | gga | ctg | gcg | ttg | ctg | atg | ctc | agc | gcc | ggc | 1776 |
| Arg | Lys | Ala | Ala | Arg | Thr | Gly | Leu | Ala | Leu | Leu | Met | Leu | Ser | Ala | Gly |      |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |      |
| gtg | ccg | atg | atc | acc | ggc | ggc | gac | gag | gcg | ctg | cgc | acc | cag | ttc | ggc | 1824 |
| Val | Pro | Met | Ile | Thr | Gly | Gly | Asp | Glu | Ala | Leu | Arg | Thr | Gln | Phe | Gly |      |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |      |
| aac | aac | aac | acc | tac | aac | ctg | gat | tcg | gcg | gcc | aac | tgg | ctg | tac | tgg | 1872 |
| Asn | Asn | Asn | Thr | Tyr | Asn | Leu | Asp | Ser | Ala | Ala | Asn | Trp | Leu | Tyr | Trp |      |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |      |
| agc | cgc | agc | gcg | ctc | gag | gcc | gac | cac | gag | acc | tac | acc | aag | cgc | ctg | 1920 |
| Ser | Arg | Ser | Ala | Leu | Glu | Ala | Asp | His | Glu | Thr | Tyr | Thr | Lys | Arg | Leu |      |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |      |

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| atc gcg ttc cgc aag gcg cac ccg gcg ctg cgc ccg gcg aac ttc tat | 1968 |
| Ile Ala Phe Arg Lys Ala His Pro Ala Leu Arg Pro Ala Asn Phe Tyr |      |
| 645 650 655                                                     |      |
| tcg gcc agc gac acc aac ggc aac gtg atg gag cag ttg cgc tgg ttc | 2016 |
| Ser Ala Ser Asp Thr Asn Gly Asn Val Met Glu Gln Leu Arg Trp Phe |      |
| 660 665 670                                                     |      |
| aag ccc gac ggc gcg cag gcc gac agc gcc tac ttc aac ggc gcc gac | 2064 |
| Lys Pro Asp Gly Ala Gln Ala Asp Ser Ala Tyr Phe Asn Gly Ala Asp |      |
| 675 680 685                                                     |      |
| aac cac gcc ctg gcc tgg cgc atc gac ggc agc gag ttc ggc gac agc | 2112 |
| Asn His Ala Leu Ala Trp Arg Ile Asp Gly Ser Glu Phe Gly Asp Ser |      |
| 690 695 700                                                     |      |
| gcc agc gcg atc tac gtc gcc tac aac ggc tgg tcc ggc gcg gtc gac | 2160 |
| Ala Ser Ala Ile Tyr Val Ala Tyr Asn Gly Trp Ser Gly Ala Val Asp |      |
| 705 710 715 720                                                 |      |
| ttc aag ctg ccg tgg ccg ggc acc ggc aag cag tgg tac cgg gtc acc | 2208 |
| Phe Lys Leu Pro Trp Pro Gly Thr Gly Lys Gln Trp Tyr Arg Val Thr |      |
| 725 730 735                                                     |      |
| gat acc gcg acc tgg aac gaa ggc ccc aac gcg gtg gcg ctg ccc ggc | 2256 |
| Asp Thr Ala Thr Trp Asn Glu Gly Pro Asn Ala Val Ala Leu Pro Gly |      |
| 740 745 750                                                     |      |
| agc gag acc ctg atc ggc ggc gag aac acc gtc tac ggc atg cag gcg | 2304 |
| Ser Glu Thr Leu Ile Gly Gly Glu Asn Thr Val Tyr Gly Met Gln Ala |      |
| 755 760 765                                                     |      |
| cgc tcg ctg ctg ttg ctg atc gcg aag tga                         | 2334 |
| Arg Ser Leu Leu Leu Leu Ile Ala Lys                             |      |
| 770 775                                                         |      |

<210> 8  
 <211> 777  
 <212> PRT  
 <213> Flavobacterium sp.

<400> 8

|                                                                 |  |
|-----------------------------------------------------------------|--|
| Met Asp Pro His Ala Pro Gln Arg Gln Arg Ser Gly Gln Arg Leu Arg |  |
| 1 5 10 15                                                       |  |
| Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Cys Ala Leu Ser Pro Ala His Ala |  |
| 20 25 30                                                        |  |
| Ala Ile Asp Ala Gln Gln Leu Gly Ala Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Ala |  |
| 35 40 45                                                        |  |

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Trp | Ser | Gly | Thr | Asp | Gly | Leu | Ser | Val | Tyr | Asn | Leu | Leu | Ser | Phe | 340 | 345 | 350 |
| Arg | Gly | Leu | Asp | Asn | Pro | Ala | Tyr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Asp | Tyr | Lys | 355 | 360 | 365 |
| Tyr | Pro | Trp | Asp | Asn | Thr | Gly | Val | Gly | Gly | Asn | Tyr | Asn | Thr | Arg | His | 370 | 375 | 380 |
| Pro | Ile | Ala | Gln | Asn | Leu | Ile | Val | Asp | Ser | Leu | Ala | Tyr | Trp | Arg | Asp | 385 | 390 | 395 |
| Ala | Leu | Gly | Val | Asp | Gly | Phe | Arg | Phe | Asp | Leu | Ala | Ser | Val | Leu | Gly | 405 | 410 | 415 |
| Asn | Ser | Cys | Gln | His | Gly | Cys | Phe | Asn | Phe | Asp | Lys | Asn | Asp | Ser | Gly | 420 | 425 | 430 |
| Asn | Ala | Leu | Asn | Arg | Ile | Val | Ala | Glu | Leu | Pro | Pro | Arg | Pro | Ala | Ala | 435 | 440 | 445 |
| Gly | Gly | Ala | Gly | Ala | Asp | Leu | Ile | Ala | Glu | Pro | Trp | Ala | Ile | Gly | Gly | 450 | 455 | 460 |
| Asn | Ser | Tyr | Gln | Val | Gly | Gly | Phe | Pro | Ala | Gly | Trp | Ala | Glu | Trp | Asn | 465 | 470 | 475 |
| Gly | Leu | Tyr | Arg | Asp | Ala | Leu | Arg | Lys | Lys | Gln | Asn | Lys | Leu | Gly | Val | 485 | 490 | 495 |
| Glu | Thr | Val | Thr | Pro | Gly | Thr | Leu | Ala | Thr | Arg | Phe | Ala | Gly | Ser | Asn | 500 | 505 | 510 |
| Asp | Leu | Tyr | Gly | Asp | Asp | Gly | Arg | Lys | Pro | Trp | His | Ser | Ile | Asn | Phe | 515 | 520 | 525 |
| Val | Val | Ala | His | Asp | Gly | Phe | Thr | Leu | Asn | Asp | Leu | Tyr | Ala | Tyr | Asn | 530 | 535 | 540 |
| Asp | Lys | Gln | Asn | Asn | Gln | Pro | Trp | Pro | Tyr | Gly | Pro | Ser | Asp | Gly | Gly | 545 | 550 | 555 |
| Glu | Asp | His | Asn | Leu | Ser | Trp | Asn | Gln | Gly | Gly | Ile | Val | Ala | Glu | Gln | 565 | 570 | 575 |
| Arg | Lys | Ala | Ala | Arg | Thr | Gly | Leu | Ala | Leu | Leu | Met | Leu | Ser | Ala | Gly | 580 | 585 | 590 |
| Val | Pro | Met | Ile | Thr | Gly | Gly | Asp | Glu | Ala | Leu | Arg | Thr | Gln | Phe | Gly | 595 | 600 | 605 |
| Asn | Asn | Asn | Thr | Tyr | Asn | Leu | Asp | Ser | Ala | Ala | Asn | Trp | Leu | Tyr | Trp | 610 | 615 | 620 |

Ser Arg Ser Ala Leu Glu Ala Asp His Glu Thr Tyr Thr Lys Arg Leu  
 625 630 635 640  
 Ile Ala Phe Arg Lys Ala His Pro Ala Leu Arg Pro Ala Asn Phe Tyr  
 645 650 655  
 Ser Ala Ser Asp Thr Asn Gly Asn Val Met Glu Gln Leu Arg Trp Phe  
 660 665 670  
 Lys Pro Asp Gly Ala Gln Ala Asp Ser Ala Tyr Phe Asn Gly Ala Asp  
 675 680 685  
 Asn His Ala Leu Ala Trp Arg Ile Asp Gly Ser Glu Phe Gly Asp Ser  
 690 695 700  
 Ala Ser Ala Ile Tyr Val Ala Tyr Asn Gly Trp Ser Gly Ala Val Asp  
 705 710 715 720  
 Phe Lys Leu Pro Trp Pro Gly Thr Gly Lys Gln Trp Tyr Arg Val Thr  
 725 730 735  
 Asp Thr Ala Thr Trp Asn Glu Gly Pro Asn Ala Val Ala Leu Pro Gly  
 740 745 750  
 Ser Glu Thr Leu Ile Gly Gly Glu Asn Thr Val Tyr Gly Met Gln Ala  
 755 760 765  
 Arg Ser Leu Leu Leu Leu Ile Ala Lys  
 770 775

<210> 9  
 <211> 2316  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas amyloclavata

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2316)

<400> 9  
 atg aag tgc cca aag att ctc ggc gcg ctg ctt ggc tgc gcg gtg ctc 48  
 Met Lys Cys Pro Lys Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Cys Ala Val Leu  
 1 5 10 15  
 gct ggt gtg ccc gca atg ccg gcg cat gcg gcc atc aac agc atg agc 96  
 Ala Gly Val Pro Ala Met Pro Ala His Ala Ala Ile Asn Ser Met Ser  
 20 25 30  
 ctg ggc gcg agc tac gac gcg caa cag gcc aac atc acc ttt cgc gtt 144  
 Leu Gly Ala Ser Tyr Asp Ala Gln Gln Ala Asn Ile Thr Phe Arg Val  
 35 40 45

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| tac tcc tcg cag gcc acg cgc atc gtg ctg tac ctc tat tcg gca ggt | 192 |
| Tyr Ser Ser Gln Ala Thr Arg Ile Val Leu Tyr Leu Tyr Ser Ala Gly |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| tac ggt gtg cag gag tcg gcc acc tac acg ctg agc cca gcg ggc agt | 240 |
| Tyr Gly Val Gln Glu Ser Ala Thr Tyr Thr Leu Ser Pro Ala Gly Ser |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ggt gta tgg gcg gtg acg gtg ccg gtg tcg tcg atc aag gcg gcc ggc | 288 |
| Gly Val Trp Ala Val Thr Val Pro Val Ser Ser Ile Lys Ala Ala Gly |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| atc acg ggg gcg gtg tac tac ggg tat cgc gcc tgg ggg ccg aat tgg | 336 |
| Ile Thr Gly Ala Val Tyr Tyr Gly Tyr Arg Ala Trp Gly Pro Asn Trp |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| cct tat gcc agc aac tgg ggc aag ggt tcg cag gcg ggc tgt gtt tcc | 384 |
| Pro Tyr Ala Ser Asn Trp Gly Lys Gly Ser Gln Ala Gly Cys Val Ser |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| gac gtc gac gcc aac ggc gac cgc ttc aat ccc aac aaa ctg ttg ttg | 432 |
| Asp Val Asp Ala Asn Gly Asp Arg Phe Asn Pro Asn Lys Leu Leu Leu |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gac ccc tac gcg cag gaa gtg agc cag gat ccg ctg aac ccg tcc aac | 480 |
| Asp Pro Tyr Ala Gln Glu Val Ser Gln Asp Pro Leu Asn Pro Ser Asn |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| cag aac ggc aac gtg ttc gcc tct gcg cac tat cgc acc acc gac agt | 528 |
| Gln Asn Gly Asn Val Phe Ala Ser Ala His Tyr Arg Thr Thr Asp Ser |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| ggc atc tat gca ccc aag ggt gtc gtg ctg gtg ccc agt acg caa agt | 576 |
| Gly Ile Tyr Ala Pro Lys Gly Val Val Leu Val Pro Ser Thr Gln Ser |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| acc ggc acc aaa ccc aca cgc gcg cag aag gat gat gtg atc tac gag | 624 |
| Thr Gly Thr Lys Pro Thr Arg Ala Gln Lys Asp Asp Val Ile Tyr Glu |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| gtg cat gtg cgc ggc ttc acc gag cag gac acc tct atc cct gcg cag | 672 |
| Val His Val Arg Gly Phe Thr Glu Gln Asp Thr Ser Ile Pro Ala Gln |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| tat cgc ggc acc tat tac ggt gca ggg ctc aag gcc agt tac ctc gcc | 720 |
| Tyr Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ala Gly Leu Lys Ala Ser Tyr Leu Ala |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| agc ctg ggc gtg acc gcg gtg gaa ttc ctg ccg gtg cag gaa acg cag | 768 |
| Ser Leu Gly Val Thr Ala Val Glu Phe Leu Pro Val Gln Glu Thr Gln |     |
| 245 250 255                                                     |     |
| aat gat gcg aac gat gtg gtt ccc aat tca gat gcc aac cag aac tac | 816 |
| Asn Asp Ala Asn Asp Val Val Pro Asn Ser Asp Ala Asn Gln Asn Tyr |     |



| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| tgg | ggc | tac | atg | acc | gag | aac | tac | ttc | tcg | ccg | gat | cgc | cgc | tat | gcc | 864  |
| Trp | Gly | Tyr | Met | Thr | Glu | Asn | Tyr | Phe | Ser | Pro | Asp | Arg | Arg | Tyr | Ala |      |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| tac | aac | aag | gcg | gct | ggc | ggt | ccc | acg | gcg | gag | ttc | cag | gcg | atg | gtg | 912  |
| Tyr | Asn | Lys | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Thr | Ala | Glu | Phe | Gln | Ala | Met | Val |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| cag | gcg | ttt | cac | aac | gca | ggc | atc | aag | gtc | tac | atg | gat | gtg | gtc | tac | 960  |
| Gln | Ala | Phe | His | Asn | Ala | Gly | Ile | Lys | Val | Tyr | Met | Asp | Val | Val | Tyr |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| aac | cac | acc | gcc | gaa | ggc | ggc | acc | tgg | acc | agc | agt | gat | ccc | acc | acg | 1008 |
| Asn | His | Thr | Ala | Glu | Gly | Gly | Thr | Trp | Thr | Ser | Ser | Asp | Pro | Thr | Thr |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| gcc | acc | att | tat | tcg | tgg | cgc | ggc | ttg | gac | aat | gcc | acg | tac | tac | gag | 1056 |
| Ala | Thr | Ile | Tyr | Ser | Trp | Arg | Gly | Leu | Asp | Asn | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Glu |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| ctg | acc | tcg | ggc | aac | caa | tac | ttc | tac | gac | aac | acg | ggc | att | ggc | gcg | 1104 |
| Leu | Thr | Ser | Gly | Asn | Gln | Tyr | Phe | Tyr | Asp | Asn | Thr | Gly | Ile | Gly | Ala |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| aac | ttc | aat | acg | tac | aac | acg | gtg | gcg | cag | aac | ctt | atc | gtc | gac | tcg | 1152 |
| Asn | Phe | Asn | Thr | Tyr | Asn | Thr | Val | Ala | Gln | Asn | Leu | Ile | Val | Asp | Ser |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| gtg | gcg | tat | tgg | gcg | aac | acg | atg | ggc | gtg | gat | ggc | ttt | cgc | ttc | gac | 1200 |
| Val | Ala | Tyr | Trp | Ala | Asn | Thr | Met | Gly | Val | Asp | Gly | Phe | Arg | Phe | Asp |      |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| ctt | gct | tcc | gtg | ctc | ggc | aac | agt | tgc | ctc | aat | gcc | gta | cac | gcg | tcc | 1248 |
| Leu | Ala | Ser | Val | Leu | Gly | Asn | Ser | Cys | Leu | Asn | Ala | Val | His | Ala | Ser |      |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |      |
| gcg | ccc | aat | tgc | ccg | aac | ggt | ggt | tat | aac | ttc | gac | gcg | gcg | gat | agc | 1296 |
| Ala | Pro | Asn | Cys | Pro | Asn | Gly | Gly | Tyr | Asn | Phe | Asp | Ala | Ala | Asp | Ser |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| aac | gta | gcg | atc | aac | cgc | atc | cta | cgc | gag | ttc | acg | gtg | cgc | ccg | gcg | 1344 |
| Asn | Val | Ala | Ile | Asn | Arg | Ile | Leu | Arg | Glu | Phe | Thr | Val | Arg | Pro | Ala |      |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| gcg | ggc | ggc | acg | gtc | tgg | atc | tgt | ttg | cgg | aac | ctt | ggg | cca | tcg | gcg | 1392 |
| Ala | Gly | Gly | Thr | Val | Trp | Ile | Cys | Leu | Arg | Asn | Leu | Gly | Pro | Ser | Ala |      |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| gca | act | cgt | acc | agc | tgg | gtg | gat | tcc | cgc | agg | gtg | gtc | cga | gtg | gaa | 1440 |
| Ala | Thr | Arg | Thr | Ser | Trp | Val | Asp | Ser | Arg | Arg | Val | Val | Arg | Val | Glu |      |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| tgg tct gtt ccg cga cag ctg cgg cag gcg cag aac gag ctg ggt agc | 1488 |
| Trp Ser Val Pro Arg Gln Leu Arg Gln Ala Gln Asn Glu Leu Gly Ser |      |
| 485 490 495                                                     |      |
| atg acc atc tat gtg acg cag gat gcg aat gat ttc tcc ggt tcg tcc | 1536 |
| Met Thr Ile Tyr Val Thr Gln Asp Ala Asn Asp Phe Ser Gly Ser Ser |      |
| 500 505 510                                                     |      |
| aat ctg ttc cag tcc agt ggg cgg tcg ccg tgg aac tcg atc aac ttt | 1584 |
| Asn Leu Phe Gln Ser Ser Gly Arg Ser Pro Trp Asn Ser Ile Asn Phe |      |
| 515 520 525                                                     |      |
| atc gac gtg cat gac ggc atg acg ttg aag gac gtg tac tcc tgc aac | 1632 |
| Ile Asp Val His Asp Gly Met Thr Leu Lys Asp Val Tyr Ser Cys Asn |      |
| 530 535 540                                                     |      |
| ggc gcc aac aac agt cag gcg tcg tac ggg ccg tcg gat ggc ggc acg | 1680 |
| Gly Ala Asn Asn Ser Gln Ala Ser Tyr Gly Pro Ser Asp Gly Gly Thr |      |
| 545 550 555 560                                                 |      |
| agc acc aat tac agt tgg gat cag ggc atg tcg gcg gga acg ggt gcc | 1728 |
| Ser Thr Asn Tyr Ser Trp Asp Gln Gly Met Ser Ala Gly Thr Gly Ala |      |
| 565 570 575                                                     |      |
| gcg gtc gac cag cgt cga gcg gca cga acg ggc atg gcc ttc gag atg | 1776 |
| Ala Val Asp Gln Arg Arg Ala Ala Arg Thr Gly Met Ala Phe Glu Met |      |
| 580 585 590                                                     |      |
| ttg tcc gcg ggc acg ccg ttg atg cag ggc ggc gac gaa tac ctg cgc | 1824 |
| Leu Ser Ala Gly Thr Pro Leu Met Gln Gly Gly Asp Glu Tyr Leu Arg |      |
| 595 600 605                                                     |      |
| acg ctc cag tgc aac aac aat gcc tac aac ctc gac tcc agc gcc aac | 1872 |
| Thr Leu Gln Cys Asn Asn Asn Ala Tyr Asn Leu Asp Ser Ser Ala Asn |      |
| 610 615 620                                                     |      |
| tgg ctt acc tat agc tgg acc acc gat caa tcg aac ttc tac acc ttc | 1920 |
| Trp Leu Thr Tyr Ser Trp Thr Thr Asp Gln Ser Asn Phe Tyr Thr Phe |      |
| 625 630 635 640                                                 |      |
| gcg caa cgc ctc att cgt tcc gca agg cac atc ccg ctt cgc ccg tcg | 1968 |
| Ala Gln Arg Leu Ile Arg Ser Ala Arg His Ile Pro Leu Arg Pro Ser |      |
| 645 650 655                                                     |      |
| agc tgg tac agc ggc agc cag ttg acg tgg tat cag ccc agt gga gcc | 2016 |
| Ser Trp Tyr Ser Gly Ser Gln Leu Thr Trp Tyr Gln Pro Ser Gly Ala |      |
| 660 665 670                                                     |      |
| gtg gcg gac agc aac tac tgg aac aac acc agc aac tac gcc att gcc | 2064 |
| Val Ala Asp Ser Asn Tyr Trp Asn Asn Thr Ser Asn Tyr Ala Ile Ala |      |
| 675 680 685                                                     |      |
| tac gcc atc aat ggg cct tcg ctg ggc gac agc aat tcc atc tat gtc | 2112 |
| Tyr Ala Ile Asn Gly Pro Ser Leu Gly Asp Ser Asn Ser Ile Tyr Val |      |

| 690                                                             | 695 | 700 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| gct tac aac ggt tgg tcg agc agc gtg act ttc acc ttg cct gcg cca |     |     | 2160 |
| Ala Tyr Asn Gly Trp Ser Ser Ser Val Thr Phe Thr Leu Pro Ala Pro |     |     |      |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720  |
| ccg tca ggc acg cag tgg tat cgc gtc acg gat acc tgc gac tgg aac |     |     | 2208 |
| Pro Ser Gly Thr Gln Trp Tyr Arg Val Thr Asp Thr Cys Asp Trp Asn |     |     |      |
|                                                                 | 725 | 730 | 735  |
| gat ggc gcc agt acg ttt gtt gca ccg ggc agc gag aca ttg atc ggc |     |     | 2256 |
| Asp Gly Ala Ser Thr Phe Val Ala Pro Gly Ser Glu Thr Leu Ile Gly |     |     |      |
|                                                                 | 740 | 745 | 750  |
| ggc gcg ggc acc acc tat ggg caa tgc ggt caa tcg ctg ctg ctg ttg |     |     | 2304 |
| Gly Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Gly Gln Ser Leu Leu Leu Leu |     |     |      |
|                                                                 | 755 | 760 | 765  |
| atc tcc aag tag                                                 |     |     | 2316 |
| Ile Ser Lys                                                     |     |     |      |
| 770                                                             |     |     |      |
|                                                                 |     |     |      |
| <210> 10                                                        |     |     |      |
| <211> 771                                                       |     |     |      |
| <212> PRT                                                       |     |     |      |
| <213> Pseudomonas amyloclavata                                  |     |     |      |
|                                                                 |     |     |      |
| <400> 10                                                        |     |     |      |
| Met Lys Cys Pro Lys Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Cys Ala Val Leu |     |     |      |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15   |
| Ala Gly Val Pro Ala Met Pro Ala His Ala Ala Ile Asn Ser Met Ser |     |     |      |
|                                                                 | 20  | 25  | 30   |
| Leu Gly Ala Ser Tyr Asp Ala Gln Gln Ala Asn Ile Thr Phe Arg Val |     |     |      |
|                                                                 | 35  | 40  | 45   |
| Tyr Ser Ser Gln Ala Thr Arg Ile Val Leu Tyr Leu Tyr Ser Ala Gly |     |     |      |
|                                                                 | 50  | 55  | 60   |
| Tyr Gly Val Gln Glu Ser Ala Thr Tyr Thr Leu Ser Pro Ala Gly Ser |     |     |      |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80   |
| Gly Val Trp Ala Val Thr Val Pro Val Ser Ser Ile Lys Ala Ala Gly |     |     |      |
|                                                                 | 85  | 90  | 95   |
| Ile Thr Gly Ala Val Tyr Tyr Gly Tyr Arg Ala Trp Gly Pro Asn Trp |     |     |      |
|                                                                 | 100 | 105 | 110  |
| Pro Tyr Ala Ser Asn Trp Gly Lys Gly Ser Gln Ala Gly Cys Val Ser |     |     |      |
|                                                                 | 115 | 120 | 125  |

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Ala | Pro | Asn | Cys | Pro | Asn | Gly | Gly | Tyr | Asn | Phe | Asp | Ala | Ala | Asp | Ser |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn | Val | Ala | Ile | Asn | Arg | Ile | Leu | Arg | Glu | Phe | Thr | Val | Arg | Pro | Ala |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Gly | Gly | Thr | Val | Trp | Ile | Cys | Leu | Arg | Asn | Leu | Gly | Pro | Ser | Ala |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Thr | Arg | Thr | Ser | Trp | Val | Asp | Ser | Arg | Arg | Val | Val | Arg | Val | Glu |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Trp | Ser | Val | Pro | Arg | Gln | Leu | Arg | Gln | Ala | Gln | Asn | Glu | Leu | Gly | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Met | Thr | Ile | Tyr | Val | Thr | Gln | Asp | Ala | Asn | Asp | Phe | Ser | Gly | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn | Leu | Phe | Gln | Ser | Ser | Gly | Arg | Ser | Pro | Trp | Asn | Ser | Ile | Asn | Phe |  |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ile | Asp | Val | His | Asp | Gly | Met | Thr | Leu | Lys | Asp | Val | Tyr | Ser | Cys | Asn |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Ala | Asn | Asn | Ser | Gln | Ala | Ser | Tyr | Gly | Pro | Ser | Asp | Gly | Gly | Thr |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Thr | Asn | Tyr | Ser | Trp | Asp | Gln | Gly | Met | Ser | Ala | Gly | Thr | Gly | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Val | Asp | Gln | Arg | Arg | Ala | Ala | Arg | Thr | Gly | Met | Ala | Phe | Glu | Met |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Ser | Ala | Gly | Thr | Pro | Leu | Met | Gln | Gly | Gly | Asp | Glu | Tyr | Leu | Arg |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Thr | Leu | Gln | Cys | Asn | Asn | Asn | Ala | Tyr | Asn | Leu | Asp | Ser | Ser | Ala | Asn |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Trp | Leu | Thr | Tyr | Ser | Trp | Thr | Thr | Asp | Gln | Ser | Asn | Phe | Tyr | Thr | Phe |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Gln | Arg | Leu | Ile | Arg | Ser | Ala | Arg | His | Ile | Pro | Leu | Arg | Pro | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Trp | Tyr | Ser | Gly | Ser | Gln | Leu | Thr | Trp | Tyr | Gln | Pro | Ser | Gly | Ala |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Val | Ala | Asp | Ser | Asn | Tyr | Trp | Asn | Asn | Thr | Ser | Asn | Tyr | Ala | Ile | Ala |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Tyr | Ala | Ile | Asn | Gly | Pro | Ser | Leu | Gly | Asp | Ser | Asn | Ser | Ile | Tyr | Val |  |  |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |

Ala Tyr Asn Gly Trp Ser Ser Ser Val Thr Phe Thr Leu Pro Ala Pro  
 705 710 715 720

Pro Ser Gly Thr Gln Trp Tyr Arg Val Thr Asp Thr Cys Asp Trp Asn  
 725 730 735

Asp Gly Ala Ser Thr Phe Val Ala Pro Gly Ser Glu Thr Leu Ile Gly  
 740 745 750

Gly Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Gly Gln Ser Leu Leu Leu Leu  
 755 760 765

Ile Ser Lys  
 770

<210> 11  
 <211> 2598  
 <212> ADN  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2598)

<400> 11  
 atg ttg ggg tct ttg ctt tta ctc tta ccc ctt gtg ggc gct gct gtc 48  
 Met Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val Gly Ala Ala Val  
 1 5 10 15

att gga ccc agg gca aac agt cag agt tgc cca ggg tat aag gcg tcc 96  
 Ile Gly Pro Arg Ala Asn Ser Gln Ser Cys Pro Gly Tyr Lys Ala Ser  
 20 25 30

aac gtc caa aag cag gct agg tca ctg act gcg gat ctg act cta gct 144  
 Asn Val Gln Lys Gln Ala Arg Ser Leu Thr Ala Asp Leu Thr Leu Ala  
 35 40 45

ggg acg cct tgt aat agc tat ggc aag gat ttg gaa gac ctc aag ctg 192  
 Gly Thr Pro Cys Asn Ser Tyr Gly Lys Asp Leu Glu Asp Leu Lys Leu  
 50 55 60

ctt gtg gaa tat cag act gat gaa cgg tta cat gtt atg atc tac gat 240  
 Leu Val Glu Tyr Gln Thr Asp Glu Arg Leu His Val Met Ile Tyr Asp  
 65 70 75 80

gcc gac gag gaa gtc tat caa gtt cct gaa tca gtc ctt cct cgc gtg 288  
 Ala Asp Glu Glu Val Tyr Gln Val Pro Glu Ser Val Leu Pro Arg Val  
 85 90 95

ggg agt gac gag gac tct gag gac agt gtt ttg gaa ttt gac tat gtg 336  
 Gly Ser Asp Glu Asp Ser Glu Asp Ser Val Leu Glu Phe Asp Tyr Val  
 100 105 110



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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Pro | Leu | Glu | Lys | Met | Arg | Glu | Leu | Val | Thr | Tyr | Leu | His | Asn | His | Asp |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| cag | cat | tac | att | gtc | atg | gtt | gac | ccg | gct | gtg | agc | gta | agc | aat | aac | 1056 |
| Gln | His | Tyr | Ile | Val | Met | Val | Asp | Pro | Ala | Val | Ser | Val | Ser | Asn | Asn |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| acg | gca | tat | atc | acc | ggc | gtg | aga | gac | gat | gtt | ttc | ctt | cac | aat | cag | 1104 |
| Thr | Ala | Tyr | Ile | Thr | Gly | Val | Arg | Asp | Asp | Val | Phe | Leu | His | Asn | Gln |      |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| aac | ggt | agc | cta | tac | gag | ggt | gct | gtt | tgg | cct | ggt | gtc | act | gtt | ttc | 1152 |
| Asn | Gly | Ser | Leu | Tyr | Glu | Gly | Ala | Val | Trp | Pro | Gly | Val | Thr | Val | Phe |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| cca | gac | tgg | ttc | aat | gag | ggt | act | cag | gat | tac | tgg | act | gcg | caa | ttt | 1200 |
| Pro | Asp | Trp | Phe | Asn | Glu | Gly | Thr | Gln | Asp | Tyr | Trp | Thr | Ala | Gln | Phe |      |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| caa | cag | ttc | ttt | gat | ccc | aag | tcc | gga | gtc | gat | att | gac | gcc | ctg | tgg | 1248 |
| Gln | Gln | Phe | Phe | Asp | Pro | Lys | Ser | Gly | Val | Asp | Ile | Asp | Ala | Leu | Trp |      |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |
| att | gac | atg | aac | gaa | gcc | tcc | aat | ttc | tgc | cct | tat | cct | tgt | ctg | gac | 1296 |
| Ile | Asp | Met | Asn | Glu | Ala | Ser | Asn | Phe | Cys | Pro | Tyr | Pro | Cys | Leu | Asp |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| cca | gcg | gca | tac | gcg | atc | tcc | gcc | gac | ctc | cca | ccg | gca | gca | cca | cct | 1344 |
| Pro | Ala | Ala | Tyr | Ala | Ile | Ser | Ala | Asp | Leu | Pro | Pro | Ala | Ala | Pro | Pro |      |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| gtt | cgg | cca | agc | agc | ccg | atc | cca | ctg | ccc | gga | ttc | ccc | gcg | gac | ttt | 1392 |
| Val | Arg | Pro | Ser | Ser | Pro | Ile | Pro | Leu | Pro | Gly | Phe | Pro | Ala | Asp | Phe |      |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| cag | cct | tcg | tct | aag | cga | tct | gtt | aaa | aga | gcg | caa | gga | gat | aaa | ggg | 1440 |
| Gln | Pro | Ser | Ser | Lys | Arg | Ser | Val | Lys | Arg | Ala | Gln | Gly | Asp | Lys | Gly |      |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |
| aag | aag | gtt | ggg | ttg | ccc | aat | cgc | aac | ctc | act | gac | ccg | ccc | tac | acc | 1488 |
| Lys | Lys | Val | Gly | Leu | Pro | Asn | Arg | Asn | Leu | Thr | Asp | Pro | Pro | Tyr | Thr |      |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |      |
| att | cgg | aat | gcc | gca | ggt | gtc | ctt | agt | atg | agc | act | atc | gag | acg | gat | 1536 |
| Ile | Arg | Asn | Ala | Ala | Gly | Val | Leu | Ser | Met | Ser | Thr | Ile | Glu | Thr | Asp |      |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |      |
| ctc | att | cat | gcg | ggt | gaa | ggg | tat | gcc | gag | tat | gat | act | cac | aat | ctc | 1584 |
| Leu | Ile | His | Ala | Gly | Glu | Gly | Tyr | Ala | Glu | Tyr | Asp | Thr | His | Asn | Leu |      |
|     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |
| tat | gga | aca | agg | tta | gtg | atg | agc | tct | gct | tcc | cgc | acg | gct | atg | cag | 1632 |
| Tyr | Gly | Thr | Arg | Leu | Val | Met | Ser | Ser | Ala | Ser | Arg | Thr | Ala | Met | Gln |      |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gcc cgc cgt ccc gat gtg agg cct ttg gtc atc act cgc agt acg ttt<br>Ala Arg Arg Pro Asp Val Arg Pro Leu Val Ile Thr Arg Ser Thr Phe<br>545 550 555 560 | 1680 |
| gca ggc gct gga gca cac gta gga cac tgg ctg ggc gac aac ttt agc<br>Ala Gly Ala Gly Ala His Val Gly His Trp Leu Gly Asp Asn Phe Ser<br>565 570 575     | 1728 |
| gat tgg gtt cac tac cgg atc tcc atc gcg cag atc ctc tcc ttc gcg<br>Asp Trp Val His Tyr Arg Ile Ser Ile Ala Gln Ile Leu Ser Phe Ala<br>580 585 590     | 1776 |
| tcc atg ttc cag att cca atg gtc ggg gct gac gtg tgt ggg ttt ggt<br>Ser Met Phe Gln Ile Pro Met Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Gly<br>595 600 605     | 1824 |
| agc aac acg acg gag gaa ttg tgt gcc cga tgg gcg tca ctt ggt gcc<br>Ser Asn Thr Thr Glu Glu Leu Cys Ala Arg Trp Ala Ser Leu Gly Ala<br>610 615 620     | 1872 |
| ttc tat acg ttc tac cgc aat cat aac gag ctg ggc gac ata tcg caa<br>Phe Tyr Thr Phe Tyr Arg Asn His Asn Glu Leu Gly Asp Ile Ser Gln<br>625 630 635 640 | 1920 |
| gag ttc tac cgc tgg cct acg gtt gcc gag tcc gcg cgt aag gcc att<br>Glu Phe Tyr Arg Trp Pro Thr Val Ala Glu Ser Ala Arg Lys Ala Ile<br>645 650 655     | 1968 |
| gac atc cgg tac aag ctc ctc gat tat atc tac act gct ctt cac cgg<br>Asp Ile Arg Tyr Lys Leu Leu Asp Tyr Ile Tyr Thr Ala Leu His Arg<br>660 665 670     | 2016 |
| caa agc cag acc ggc gag cca ttc ctg cag cct caa ttc tac ctg tac<br>Gln Ser Gln Thr Gly Glu Pro Phe Leu Gln Pro Gln Phe Tyr Leu Tyr<br>675 680 685     | 2064 |
| cct gag gat tcg aac acc ttt gcg aac gac cgg cag ttc ttc tat ggt<br>Pro Glu Asp Ser Asn Thr Phe Ala Asn Asp Arg Gln Phe Phe Tyr Gly<br>690 695 700     | 2112 |
| gac gcc ctt ctt gtc agc ccc gtg ttg aat gag gga tcc acc tca gtc<br>Asp Ala Leu Leu Val Ser Pro Val Leu Asn Glu Gly Ser Thr Ser Val<br>705 710 715 720 | 2160 |
| gac gca tac ttc ccg gac gac atc ttc tac gat tgg tac aca ggg gca<br>Asp Ala Tyr Phe Pro Asp Asp Ile Phe Tyr Asp Trp Tyr Thr Gly Ala<br>725 730 735     | 2208 |
| gtg gtg cgt ggg cac gga gaa aac atc acg ctc agc aac atc aac atc<br>Val Val Arg Gly His Gly Glu Asn Ile Thr Leu Ser Asn Ile Asn Ile<br>740 745 750     | 2256 |
| acc cac atc cct ctg cac atc cgc ggt gga aat atc ata cct gtc agg                                                                                       | 2304 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Thr | His | Ile | Pro | Leu | His | Ile | Arg | Gly | Gly | Asn | Ile | Ile | Pro | Val | Arg |  |      |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |  |      |
| aca | tcc | agc | ggc | atg | aca | acc | act | gag | gtt | cgt | aag | cag | ggc | ttc | gag |  | 2352 |
| Thr | Ser | Ser | Gly | Met | Thr | Thr | Thr | Glu | Val | Arg | Lys | Gln | Gly | Phe | Glu |  |      |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |  |      |
| ctg | atc | atc | gcg | cca | gac | ttg | gat | gac | acc | gca | tcg | ggc | agt | cta | tat |  | 2400 |
| Leu | Ile | Ile | Ala | Pro | Asp | Leu | Asp | Asp | Thr | Ala | Ser | Gly | Ser | Leu | Tyr |  |      |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |  |      |
| ttg | gat | gat | gga | gac | tcg | ttg | aac | ccg | tca | tct | gtg | aca | gag | ctc | gag |  | 2448 |
| Leu | Asp | Asp | Gly | Asp | Ser | Leu | Asn | Pro | Ser | Ser | Val | Thr | Glu | Leu | Glu |  |      |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |  |      |
| ttc | acg | tac | agc | aaa | ggg | gag | ttg | cac | gtg | aag | ggg | aca | ttc | gga | cag |  | 2496 |
| Phe | Thr | Tyr | Ser | Lys | Gly | Glu | Leu | His | Val | Lys | Gly | Thr | Phe | Gly | Gln |  |      |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |  |      |
| aag | gcc | gtc | ccc | aag | gtg | gag | aaa | tgt | acc | ttg | ctg | ggg | aag | tca | gca |  | 2544 |
| Lys | Ala | Val | Pro | Lys | Val | Glu | Lys | Cys | Thr | Leu | Leu | Gly | Lys | Ser | Ala |  |      |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |  |      |
| cgg | acg | ttc | aag | ggc | ttt | gca | ctc | gat | gcg | ccg | gtg | aac | ttt | aag | ctg |  | 2592 |
| Arg | Thr | Phe | Lys | Gly | Phe | Ala | Leu | Asp | Ala | Pro | Val | Asn | Phe | Lys | Leu |  |      |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |  |      |
| aag | tag |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  | 2598 |
| Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |      |
| 865 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |      |

<210> 12  
 <211> 865  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger

<400> 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Met | Leu | Gly | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Pro | Leu | Val | Gly | Ala | Ala | Val |  |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |
| Ile | Gly | Pro | Arg | Ala | Asn | Ser | Gln | Ser | Cys | Pro | Gly | Tyr | Lys | Ala | Ser |  |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |
| Asn | Val | Gln | Lys | Gln | Ala | Arg | Ser | Leu | Thr | Ala | Asp | Leu | Thr | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Pro | Cys | Asn | Ser | Tyr | Gly | Lys | Asp | Leu | Glu | Asp | Leu | Lys | Leu |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Val | Glu | Tyr | Gln | Thr | Asp | Glu | Arg | Leu | His | Val | Met | Ile | Tyr | Asp |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Asp | Glu | Glu | Val | Tyr | Gln | Val | Pro | Glu | Ser | Val | Leu | Pro | Arg | Val | 85  | 90  | 95  |
| Gly | Ser | Asp | Glu | Asp | Ser | Glu | Asp | Ser | Val | Leu | Glu | Phe | Asp | Tyr | Val | 100 | 105 | 110 |
| Glu | Glu | Pro | Phe | Ser | Phe | Thr | Ile | Ser | Lys | Gly | Asp | Glu | Val | Leu | Phe | 115 | 120 | 125 |
| Asp | Ser | Ser | Ala | Ser | Pro | Leu | Val | Phe | Gln | Ser | Gln | Tyr | Val | Asn | Leu | 130 | 135 | 140 |
| Arg | Thr | Trp | Leu | Pro | Asp | Asp | Pro | Tyr | Val | Tyr | Gly | Leu | Gly | Glu | His | 145 | 150 | 155 |
| Ser | Asp | Pro | Met | Arg | Leu | Pro | Thr | Tyr | Asn | Tyr | Thr | Arg | Thr | Leu | Trp | 165 | 170 | 175 |
| Asn | Arg | Asp | Ala | Tyr | Gly | Thr | Pro | Asn | Asn | Thr | Asn | Leu | Tyr | Gly | Ser | 180 | 185 | 190 |
| His | Pro | Val | Tyr | Tyr | Asp | His | Arg | Gly | Lys | Ser | Gly | Thr | Tyr | Gly | Val | 195 | 200 | 205 |
| Phe | Leu | Leu | Asn | Ser | Asn | Gly | Met | Asp | Ile | Lys | Ile | Asn | Gln | Thr | Thr | 210 | 215 | 220 |
| Asp | Gly | Lys | Gln | Tyr | Leu | Glu | Tyr | Asn | Leu | Leu | Gly | Gly | Val | Leu | Asp | 225 | 230 | 235 |
| Phe | Tyr | Phe | Phe | Tyr | Gly | Glu | Asp | Pro | Lys | Gln | Ala | Ser | Met | Glu | Tyr | 245 | 250 | 255 |
| Ser | Lys | Ile | Val | Gly | Leu | Pro | Ala | Met | Gln | Ser | Tyr | Trp | Thr | Phe | Gly | 260 | 265 | 270 |
| Val | Cys | Pro | Pro | Pro | Pro | Asn | Pro | Ile | Thr | Val | Arg | Val | Val | Val | Tyr | 275 | 280 | 285 |
| Asn | Tyr | Ser | Gln | Ala | Lys | Ile | Pro | Leu | Glu | Thr | Met | Trp | Thr | Asp | Ile | 290 | 295 | 300 |
| Asp | Tyr | Met | Asp | Lys | Arg | Arg | Val | Phe | Thr | Leu | Asp | Pro | Gln | Arg | Phe | 305 | 310 | 315 |
| Pro | Leu | Glu | Lys | Met | Arg | Glu | Leu | Val | Thr | Tyr | Leu | His | Asn | His | Asp | 325 | 330 | 335 |
| Gln | His | Tyr | Ile | Val | Met | Val | Asp | Pro | Ala | Val | Ser | Val | Ser | Asn | Asn | 340 | 345 | 350 |
| Thr | Ala | Tyr | Ile | Thr | Gly | Val | Arg | Asp | Asp | Val | Phe | Leu | His | Asn | Gln | 355 | 360 | 365 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Gly | Ser | Leu | Tyr | Glu | Gly | Ala | Val | Trp | Pro | Gly | Val | Thr | Val | Phe | 370 | 375 | 380 |
| Pro | Asp | Trp | Phe | Asn | Glu | Gly | Thr | Gln | Asp | Tyr | Trp | Thr | Ala | Gln | Phe | 385 | 390 | 395 |
| Gln | Gln | Phe | Phe | Asp | Pro | Lys | Ser | Gly | Val | Asp | Ile | Asp | Ala | Leu | Trp | 405 | 410 | 415 |
| Ile | Asp | Met | Asn | Glu | Ala | Ser | Asn | Phe | Cys | Pro | Tyr | Pro | Cys | Leu | Asp | 420 | 425 | 430 |
| Pro | Ala | Ala | Tyr | Ala | Ile | Ser | Ala | Asp | Leu | Pro | Pro | Ala | Ala | Pro | Pro | 435 | 440 | 445 |
| Val | Arg | Pro | Ser | Ser | Pro | Ile | Pro | Leu | Pro | Gly | Phe | Pro | Ala | Asp | Phe | 450 | 455 | 460 |
| Gln | Pro | Ser | Ser | Lys | Arg | Ser | Val | Lys | Arg | Ala | Gln | Gly | Asp | Lys | Gly | 465 | 470 | 475 |
| Lys | Lys | Val | Gly | Leu | Pro | Asn | Arg | Asn | Leu | Thr | Asp | Pro | Pro | Tyr | Thr | 485 | 490 | 495 |
| Ile | Arg | Asn | Ala | Ala | Gly | Val | Leu | Ser | Met | Ser | Thr | Ile | Glu | Thr | Asp | 500 | 505 | 510 |
| Leu | Ile | His | Ala | Gly | Glu | Gly | Tyr | Ala | Glu | Tyr | Asp | Thr | His | Asn | Leu | 515 | 520 | 525 |
| Tyr | Gly | Thr | Arg | Leu | Val | Met | Ser | Ser | Ala | Ser | Arg | Thr | Ala | Met | Gln | 530 | 535 | 540 |
| Ala | Arg | Arg | Pro | Asp | Val | Arg | Pro | Leu | Val | Ile | Thr | Arg | Ser | Thr | Phe | 545 | 550 | 555 |
| Ala | Gly | Ala | Gly | Ala | His | Val | Gly | His | Trp | Leu | Gly | Asp | Asn | Phe | Ser | 565 | 570 | 575 |
| Asp | Trp | Val | His | Tyr | Arg | Ile | Ser | Ile | Ala | Gln | Ile | Leu | Ser | Phe | Ala | 580 | 585 | 590 |
| Ser | Met | Phe | Gln | Ile | Pro | Met | Val | Gly | Ala | Asp | Val | Cys | Gly | Phe | Gly | 595 | 600 | 605 |
| Ser | Asn | Thr | Thr | Glu | Glu | Leu | Cys | Ala | Arg | Trp | Ala | Ser | Leu | Gly | Ala | 610 | 615 | 620 |
| Phe | Tyr | Thr | Phe | Tyr | Arg | Asn | His | Asn | Glu | Leu | Gly | Asp | Ile | Ser | Gln | 625 | 630 | 635 |
| Glu | Phe | Tyr | Arg | Trp | Pro | Thr | Val | Ala | Glu | Ser | Ala | Arg | Lys | Ala | Ile | 645 | 650 | 655 |



```

Asp Ile Arg Tyr Lys Leu Leu Asp Tyr Ile Tyr Thr Ala Leu His Arg
      660                      665                      670

Gln Ser Gln Thr Gly Glu Pro Phe Leu Gln Pro Gln Phe Tyr Leu Tyr
      675                      680                      685

Pro Glu Asp Ser Asn Thr Phe Ala Asn Asp Arg Gln Phe Phe Tyr Gly
      690                      695                      700

Asp Ala Leu Leu Val Ser Pro Val Leu Asn Glu Gly Ser Thr Ser Val
705                      710                      715

Asp Ala Tyr Phe Pro Asp Asp Ile Phe Tyr Asp Trp Tyr Thr Gly Ala
      725                      730                      735

Val Val Arg Gly His Gly Glu Asn Ile Thr Leu Ser Asn Ile Asn Ile
      740                      745                      750

Thr His Ile Pro Leu His Ile Arg Gly Gly Asn Ile Ile Pro Val Arg
      755                      760                      765

Thr Ser Ser Gly Met Thr Thr Thr Glu Val Arg Lys Gln Gly Phe Glu
      770                      775                      780

Leu Ile Ile Ala Pro Asp Leu Asp Asp Thr Ala Ser Gly Ser Leu Tyr
785                      790                      795                      800

Leu Asp Asp Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ser Ser Val Thr Glu Leu Glu
      805                      810                      815

Phe Thr Tyr Ser Lys Gly Glu Leu His Val Lys Gly Thr Phe Gly Gln
      820                      825                      830

Lys Ala Val Pro Lys Val Glu Lys Cys Thr Leu Leu Gly Lys Ser Ala
      835                      840                      845

Arg Thr Phe Lys Gly Phe Ala Leu Asp Ala Pro Val Asn Phe Lys Leu
      850                      855                      860

```

Lys  
865

```

<210> 13
<211> 2502
<212> ADN
<213> Paenibacillus macerans

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (35)..(2176)

```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (35)..(115)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (116)..(2176)

&lt;400&gt; 13

gatcggcaga acatttgaga ggagaggtag gaca atg aaa tcg cgg tac aaa cgt 55  
 Met Lys Ser Arg Tyr Lys Arg  
 -25

ttg acc tcc ctg gcg ctt tcg ctg agt atg gcg ttg ggg att tca ctg 103  
 Leu Thr Ser Leu Ala Leu Ser Leu Ser Met Ala Leu Gly Ile Ser Leu  
 -20 -15 -10 -5

ccc gca tgg gca tca ccc gat acg agc gtg gac aac aag gtc aat ttc 151  
 Pro Ala Trp Ala Ser Pro Asp Thr Ser Val Asp Asn Lys Val Asn Phe  
 -1 1 5 10

agt acg gac gtc atc tat cag att gtg acc gac cgc ttc gcg gac ggg 199  
 Ser Thr Asp Val Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Ala Asp Gly  
 15 20 25

gac agg acg aac aat ccg gcg ggg gat gcg ttc agc ggc gac cga tcc 247  
 Asp Arg Thr Asn Asn Pro Ala Gly Asp Ala Phe Ser Gly Asp Arg Ser  
 30 35 40

aat ttg aag ctc tat ttc ggg gga gac tgg cag ggg att atc gac aag 295  
 Asn Leu Lys Leu Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asp Lys  
 45 50 55 60

att aac gac ggt tat ttg acc ggc atg ggc gtc acc gcc ctc tgg ata 343  
 Ile Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Gly Met Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile  
 65 70 75

tcc caa cct gtg gaa aat atc acc tcc gtc atc aag tat tcc ggc gtt 391  
 Ser Gln Pro Val Glu Asn Ile Thr Ser Val Ile Lys Tyr Ser Gly Val  
 80 85 90

aac aat acg tct tat cac ggt tac tgg gcg agg gat ttt aag caa acc 439  
 Asn Asn Thr Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Gln Thr  
 95 100 105

aac gac gct ttc ggg gat ttt gcc gat ttt caa aat ctg att gat acg 487  
 Asn Asp Ala Phe Gly Asp Phe Ala Asp Phe Gln Asn Leu Ile Asp Thr  
 110 115 120

ctc acg ctc ata aca tca agg tcg gat cga ctt cgc ccc caa cca cac 535  
 Leu Thr Leu Ile Thr Ser Arg Ser Asp Arg Leu Arg Pro Gln Pro His  
 125 130 135 140

gtc tcc ggc cga gca ggg acg aac ccc ggc ttc gcc gag aac ggt gcg 583

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Val | Ser | Gly | Arg | Ala | Gly | Thr | Asn | Pro | Gly | Phe | Ala | Glu | Asn | Gly | Ala |      |
|     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |      |
| ctg | tat | gat | aac | ggg | tcg | ctg | ctc | ggc | gcc | tac | agc | aat | gat | acg | gcc | 631  |
| Leu | Tyr | Asp | Asn | Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Ala | Tyr | Ser | Asn | Asp | Thr | Ala |      |
|     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |      |
| ggc | ctt | ttc | cat | cat | aac | ggg | ggg | acc | gat | ttt | tcc | acg | att | gaa | gac | 679  |
| Gly | Leu | Phe | His | His | Asn | Gly | Gly | Thr | Asp | Phe | Ser | Thr | Ile | Glu | Asp |      |
|     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |      |
| ggg | att | tac | aag | aac | ctc | tac | gac | ctg | gcg | gac | atc | aac | cat | aac | aac | 727  |
| Gly | Ile | Tyr | Lys | Asn | Leu | Tyr | Asp | Leu | Ala | Asp | Ile | Asn | His | Asn | Asn |      |
|     | 190 |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |      |
| aac | gct | atg | gac | gct | tat | ttt | aaa | agc | gct | atc | gac | ctt | tgg | ctc | ggc | 775  |
| Asn | Ala | Met | Asp | Ala | Tyr | Phe | Lys | Ser | Ala | Ile | Asp | Leu | Trp | Leu | Gly |      |
| 205 |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |      |
| atg | ggg | gtg | gac | ggg | att | cgt | ttt | gac | gcg | gtg | aag | cag | tat | cct | ttc | 823  |
| Met | Gly | Val | Asp | Gly | Ile | Arg | Phe | Asp | Ala | Val | Lys | Gln | Tyr | Pro | Phe |      |
|     |     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |      |
| ggc | tgg | caa | aaa | agc | ttc | gtt | tcc | tcg | att | tac | ggc | ggc | gat | cat | ccg | 871  |
| Gly | Trp | Gln | Lys | Ser | Phe | Val | Ser | Ser | Ile | Tyr | Gly | Gly | Asp | His | Pro |      |
|     |     |     | 240 |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |      |
| gta | ttt | acg | ttc | ggg | gaa | tgg | tat | ctt | ggc | gcg | gat | caa | acc | gac | gga | 919  |
| Val | Phe | Thr | Phe | Gly | Glu | Trp | Tyr | Leu | Gly | Ala | Asp | Gln | Thr | Asp | Gly |      |
|     |     | 255 |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |      |
| gac | aac | att | aaa | ttc | gcc | aac | gaa | agc | ggg | atg | aac | ctg | ctg | gac | ttt | 967  |
| Asp | Asn | Ile | Lys | Phe | Ala | Asn | Glu | Ser | Gly | Met | Asn | Leu | Leu | Asp | Phe |      |
|     | 270 |     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |      |
| gaa | tac | gcg | cag | gaa | gtg | cgc | gaa | gtg | ttc | cgg | gac | aaa | acg | gaa | acg | 1015 |
| Glu | Tyr | Ala | Gln | Glu | Val | Arg | Glu | Val | Phe | Arg | Asp | Lys | Thr | Glu | Thr |      |
| 285 |     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |      |
| atg | aag | gat | ctc | tat | gag | gtg | ctg | gcc | agc | acg | gag | tcg | caa | tac | gac | 1063 |
| Met | Lys | Asp | Leu | Tyr | Glu | Val | Leu | Ala | Ser | Thr | Glu | Ser | Gln | Tyr | Asp |      |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |      |
| tac | atc | aac | aat | atg | gtg | acc | ttc | atc | gac | aac | cat | gat | atg | gac | cgg | 1111 |
| Tyr | Ile | Asn | Asn | Met | Val | Thr | Phe | Ile | Asp | Asn | His | Asp | Met | Asp | Arg |      |
|     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |      |
| ttc | cag | gtt | gcc | ggg | tcc | ggg | acg | cgg | gcg | acc | gag | caa | gcg | ttg | gcg | 1159 |
| Phe | Gln | Val | Ala | Gly | Ser | Gly | Thr | Arg | Ala | Thr | Glu | Gln | Ala | Leu | Ala |      |
|     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |      |
| ctg | acg | ctg | act | tcc | cgc | ggc | gtg | cca | gcc | atc | tac | tac | ggc | acg | gag | 1207 |
| Leu | Thr | Leu | Thr | Ser | Arg | Gly | Val | Pro | Ala | Ile | Tyr | Tyr | Gly | Thr | Glu |      |
|     | 350 |     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |      |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| cag tac atg acc ggc gat ggc gac ccc aac aac cgg gcg atg atg acc<br>Gln Tyr Met Thr Gly Asp Gly Asp Pro Asn Asn Arg Ala Met Met Thr<br>365 370 375 380 | 1255 |
| tcg ttt aat acc ggg acg acg gct tat aaa gtg att cag gca ttg gcg<br>Ser Phe Asn Thr Gly Thr Thr Ala Tyr Lys Val Ile Gln Ala Leu Ala<br>385 390 395     | 1303 |
| ccg ctg cgt aaa tcc aat ccg gcc atc gct tat ggg acg acg aca gag<br>Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Thr Thr Thr Glu<br>400 405 410     | 1351 |
| cgc tgg gtt aac aac gat gtg ttg att att gaa cgc aaa ttc ggc agc<br>Arg Trp Val Asn Asn Asp Val Leu Ile Ile Glu Arg Lys Phe Gly Ser<br>415 420 425     | 1399 |
| agc gcc gct ttg gtg gcg att aat cga aac tcg tcc gcc gct tat ccg<br>Ser Ala Ala Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Ser Ser Ala Ala Tyr Pro<br>430 435 440     | 1447 |
| att tcg ggt ctg ttg agt tcg ctg ccg gcg ggc act tat tcg gat gta<br>Ile Ser Gly Leu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Ser Asp Val<br>445 450 455 460 | 1495 |
| ttg aac gga ctc tta aac ggc aac tcc att acc gtg ggc agc ggc ggc<br>Leu Asn Gly Leu Leu Asn Gly Asn Ser Ile Thr Val Gly Ser Gly Gly<br>465 470 475     | 1543 |
| gcc gtc acc aac ttt acg ctg gcg gcc ggc ggc acg gcg gta tgg cag<br>Ala Val Thr Asn Phe Thr Leu Ala Ala Gly Gly Thr Ala Val Trp Gln<br>480 485 490     | 1591 |
| tac aca gcg ccg gaa acg tcg ccg gcg atc ggc aat gtg ggt ccc acc<br>Tyr Thr Ala Pro Glu Thr Ser Pro Ala Ile Gly Asn Val Gly Pro Thr<br>495 500 505     | 1639 |
| atg ggc cag ccg ggg aat ata gtg acg att gac ggg cgc ggc ttt ggc<br>Met Gly Gln Pro Gly Asn Ile Val Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly<br>510 515 520     | 1687 |
| ggc acg gcg ggc acg gtt tat ttc ggg acg acg gcg gtg acc ggc tcc<br>Gly Thr Ala Gly Thr Val Tyr Phe Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser<br>525 530 535 540 | 1735 |
| ggc atc gta agc tgg gag gac acg cag att aag gcg gtc ata ccg aag<br>Gly Ile Val Ser Trp Glu Asp Thr Gln Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys<br>545 550 555     | 1783 |
| gtc gcg gcg ggc aaa acg ggc gta tcg gtc aaa acg tcg tcc ggc acc<br>Val Ala Ala Gly Lys Thr Gly Val Ser Val Lys Thr Ser Ser Gly Thr<br>560 565 570     | 1831 |
| gcc agc aat aca ttc aaa agc ttc aat gta ctg acg ggg gat cag gtc                                                                                       | 1879 |

|        |                        |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--------|------------------------|------------|----------------------------------------------|------------|------------|------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Ala    | Ser                    | Asn        | Thr                                          | Phe        | Lys        | Ser        | Phe  | Asn | Val | Leu | Thr | Gly | Asp | Gln | Val |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        | 575        |                                              |            |            |            | 580  |     |     |     |     | 585 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| acg    | gtg                    | cgt        | ttc                                          | ctg        | gtc        | aat        | caa  | gcc | aat | acc | aat | tac | gga | aca | aat | 1927 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Thr    | Val                    | Arg        | Phe                                          | Leu        | Val        | Asn        | Gln  | Ala | Asn | Thr | Asn | Tyr | Gly | Thr | Asn |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        | 590                    |            |                                              |            |            | 595        |      |     |     |     | 600 |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gtt    | tat                    | ctt        | gtc                                          | ggc        | aac        | gcc        | gcc  | gag | ctc | ggc | acc | tgg | gac | ccg | aac | 1975 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Val    | Tyr                    | Leu        | Val                                          | Gly        | Asn        | Ala        | Ala  | Glu | Leu | Gly | Thr | Trp | Asp | Pro | Asn |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 605    |                        |            |                                              |            | 610        |            |      |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aaa    | gcg                    | att        | ggg                                          | ccg        | atg        | tac        | aat  | cag | gtg | atc | gcc | aag | tac | ccg | tcc | 2023 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys    | Ala                    | Ile        | Gly                                          | Pro        | Met        | Tyr        | Asn  | Gln | Val | Ile | Ala | Lys | Tyr | Pro | Ser |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        |            |                                              | 625        |            |            |      |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tgg    | tat                    | tac        | gat                                          | gtc        | agc        | gtg        | ccg  | gcg | ggg | aca | aag | ctg | gat | ttt | aaa | 2071 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Trp    | Tyr                    | Tyr        | Asp                                          | Val        | Ser        | Val        | Pro  | Ala | Gly | Thr | Lys | Leu | Asp | Phe | Lys |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        |            | 640                                          |            |            |            |      | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ttt    | att                    | aaa        | aag                                          | ggc        | ggc        | ggt        | acg  | gtg | act | tgg | gaa | ggc | ggg | ggc | aac | 2119 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Phe    | Ile                    | Lys        | Lys                                          | Gly        | Gly        | Gly        | Thr  | Val | Thr | Trp | Glu | Gly | Gly | Gly | Asn |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        | 655        |                                              |            |            |            | 660  |     |     |     |     | 665 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cat    | acg                    | tac        | acg                                          | acg        | ccg        | gcc        | agc  | ggc | gta | ggg | acg | gtg | acg | gtg | gac | 2167 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| His    | Thr                    | Tyr        | Thr                                          | Thr        | Pro        | Ala        | Ser  | Gly | Val | Gly | Thr | Val | Thr | Val | Asp |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        | 670                    |            |                                              |            |            | 675        |      |     |     |     | 680 |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tgg    | caa                    | aat        | taagcgggcta agcggccggc ctgaacgaga ggcacccggc |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     | 2216 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Trp    | Gln                    | Asn        |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 685    |                        |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aaaaa  | actgc                  | ggcggccggc | agttaaagtc                                   | gacgtgcaaa | cgtgccgggg | aggattgtga | 2276 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aatac  | aggtg                  | cgggatccag | gagaacaaaa                                   | acgatttttt | gaggaaagtt | ataaattatt | 2336 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ttccg  | aacga                  | tatggcaagc | aaaatattgc                                   | ttatgcaaca | gttcataatg | atgagcaaac | 2396 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ccctc  | acatg                  | catttaggtg | ttgtgcctat                                   | gcgtgatgga | aaatgcaagg | aaaaaatgtg | 2456 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tttaat | cgtc                   | aagactgtta | tggctacagt                                   | aatcccgcgc | atatga     |            | 2502 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <210>  | 14                     |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <211>  | 714                    |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <212>  | PRT                    |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <213>  | Paenibacillus macerans |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <400>  | 14                     |            |                                              |            |            |            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Met    | Lys                    | Ser        | Arg                                          | Tyr        | Lys        | Arg        | Leu  | Thr | Ser | Leu | Ala | Leu | Ser | Leu | Ser |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        |                        | -25        |                                              |            |            |            | -20  |     |     |     |     | -15 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Met    | Ala                    | Leu        | Gly                                          | Ile        | Ser        | Leu        | Pro  | Ala | Trp | Ala | Ser | Pro | Asp | Thr | Ser |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|        | -10                    |            |                                              |            |            | -5         |      |     |     | -1  | 1   |     |     |     | 5   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

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



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Arg | Asp | Lys | Thr | Glu | Thr | Met | Lys | Asp | Leu | Tyr | Glu | Val | Leu | Ala | 295 | 300 | 305 |
| Ser | Thr | Glu | Ser | Gln | Tyr | Asp | Tyr | Ile | Asn | Asn | Met | Val | Thr | Phe | Ile | 310 | 315 | 320 |
| Asp | Asn | His | Asp | Met | Asp | Arg | Phe | Gln | Val | Ala | Gly | Ser | Gly | Thr | Arg | 330 | 335 | 340 |
| Ala | Thr | Glu | Gln | Ala | Leu | Ala | Leu | Thr | Leu | Thr | Ser | Arg | Gly | Val | Pro | 345 | 350 | 355 |
| Ala | Ile | Tyr | Tyr | Gly | Thr | Glu | Gln | Tyr | Met | Thr | Gly | Asp | Gly | Asp | Pro | 360 | 365 | 370 |
| Asn | Asn | Arg | Ala | Met | Met | Thr | Ser | Phe | Asn | Thr | Gly | Thr | Thr | Ala | Tyr | 375 | 380 | 385 |
| Lys | Val | Ile | Gln | Ala | Leu | Ala | Pro | Leu | Arg | Lys | Ser | Asn | Pro | Ala | Ile | 390 | 395 | 400 |
| Ala | Tyr | Gly | Thr | Thr | Thr | Glu | Arg | Trp | Val | Asn | Asn | Asp | Val | Leu | Ile | 410 | 415 | 420 |
| Ile | Glu | Arg | Lys | Phe | Gly | Ser | Ser | Ala | Ala | Leu | Val | Ala | Ile | Asn | Arg | 425 | 430 | 435 |
| Asn | Ser | Ser | Ala | Ala | Tyr | Pro | Ile | Ser | Gly | Leu | Leu | Ser | Ser | Leu | Pro | 440 | 445 | 450 |
| Ala | Gly | Thr | Tyr | Ser | Asp | Val | Leu | Asn | Gly | Leu | Leu | Asn | Gly | Asn | Ser | 455 | 460 | 465 |
| Ile | Thr | Val | Gly | Ser | Gly | Gly | Ala | Val | Thr | Asn | Phe | Thr | Leu | Ala | Ala | 470 | 475 | 480 |
| Gly | Gly | Thr | Ala | Val | Trp | Gln | Tyr | Thr | Ala | Pro | Glu | Thr | Ser | Pro | Ala | 490 | 495 | 500 |
| Ile | Gly | Asn | Val | Gly | Pro | Thr | Met | Gly | Gln | Pro | Gly | Asn | Ile | Val | Thr | 505 | 510 | 515 |
| Ile | Asp | Gly | Arg | Gly | Phe | Gly | Gly | Thr | Ala | Gly | Thr | Val | Tyr | Phe | Gly | 520 | 525 | 530 |
| Thr | Thr | Ala | Val | Thr | Gly | Ser | Gly | Ile | Val | Ser | Trp | Glu | Asp | Thr | Gln | 535 | 540 | 545 |
| Ile | Lys | Ala | Val | Ile | Pro | Lys | Val | Ala | Ala | Gly | Lys | Thr | Gly | Val | Ser | 550 | 555 | 560 |
| Val | Lys | Thr | Ser | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Asn | Thr | Phe | Lys | Ser | Phe | Asn | 570 | 575 | 580 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Thr | Gly | Asp | Gln | Val | Thr | Val | Arg | Phe | Leu | Val | Asn | Gln | Ala |
|     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |     |     | 595 |     |     |
| Asn | Thr | Asn | Tyr | Gly | Thr | Asn | Val | Tyr | Leu | Val | Gly | Asn | Ala | Ala | Glu |
|     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |     | 610 |     |     |     |
| Leu | Gly | Thr | Trp | Asp | Pro | Asn | Lys | Ala | Ile | Gly | Pro | Met | Tyr | Asn | Gln |
|     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     | 625 |     |     |     |     |
| Val | Ile | Ala | Lys | Tyr | Pro | Ser | Trp | Tyr | Tyr | Asp | Val | Ser | Val | Pro | Ala |
| 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |     |     |     |     | 645 |
| Gly | Thr | Lys | Leu | Asp | Phe | Lys | Phe | Ile | Lys | Lys | Gly | Gly | Gly | Thr | Val |
|     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |     |     |     | 660 |     |
| Thr | Trp | Glu | Gly | Gly | Gly | Asn | His | Thr | Tyr | Thr | Thr | Pro | Ala | Ser | Gly |
|     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     | 675 |     |     |
| Val | Gly | Thr | Val | Thr | Val | Asp | Trp | Gln | Asn |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |     |     |     |     |     |