



(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)



1-0023512

(51)⁷ C12N 15/09; C12N 9/42; C12N 1/19

(13) B

(21) 1-2014-02206

(22) 07/07/2014

(30) 2013-143256 09/07/2013 JP

(45) 27/04/2020 385

(43) 26/01/2015 322A

(73) HONDA MOTOR CO., LTD. (JP)

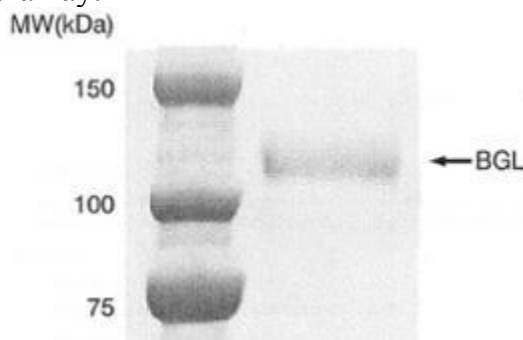
1-1, Minami-Aoyama 2-chome, Minato-ku, Tokyo 107-8556, Japan

(72) Maiko TANAKA (JP); Shigenobu MITSUZAWA (JP); Satoru SHINKAWA (JP);
Daisuke SHIBATA (JP); Takeshi ARA (JP); Migiwa TAKEDA (JP)

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) ENZYM BETA-GLUCOSIDAZA, VECTƠ BIỂU HIỆN ENZYM NÀY, THỂ BIẾN NẠP CHỨA VECTƠ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM PHÂN GIẢI XENLULOZA BẰNG ENZYM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến enzym β -glucosidaza chứa miền xúc tác của β -glucosidaza bao gồm: (A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza, hoặc (C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa β -glucosidaza này, vectơ biểu hiện β -glucosidaza này, thể biến nạp chứa vectơ biểu hiện này, phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza này, hỗn hợp xenlulaza chứa enzym này và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng β -glucosidaza này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến enzym β -glucosidaza thu được từ nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến β -glucosidaza thể hệ mới, polynucleotit mã hóa β -glucosidaza này, vector biểu hiện β -glucosidaza này, thể biến nạp chứa vector biểu hiện này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng β -glucosidaza này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, việc phát triển các nguồn năng lượng thay thế dầu mỏ là vấn đề rất quan trọng, do các quan ngại liên quan đến việc cung cấp năng lượng cho các thiết bị vận tải, như sự tăng giá dầu và nguy cơ cạn kiệt dầu khí trong tương lai gần, cũng như các vấn đề về môi trường như trái đất nóng lên và ô nhiễm bầu khí quyển. Sinh khối thực vật hoặc lignoxenluloza, là nguồn năng lượng tái tạo phong phú nhất trên trái đất, được mong đợi là nguồn năng lượng thay thế cho dầu mỏ. Các thành phần chính trong phần khô của sinh khối này bao gồm các polysacarit như xenluloza, hemixenluloza, và lignin. Ví dụ, các polysacarit được sử dụng làm nhiên liệu sinh học hoặc nguyên liệu hóa học thô, sau khi được thủy phân thành các monosacarit như glucoza hoặc xyloza bởi các glycosit hydrolaza có tên chung là các enzym xenlulaza.

Do đó, trong lĩnh vực năng lượng sinh học, rất cần phát triển nhiều enzym xenlulaza có hoạt tính mạnh để thực hiện một cách hiệu quả quá trình thủy phân enzym sinh khối chứa xenluloza.

Lignoxenluloza là hợp chất có cấu trúc rất phức tạp, nên rất khó có thể phân giải được bằng một enzym phân giải xenluloza duy nhất. Quá trình phân giải lignoxenluloza thành đường cần ít nhất ba loại enzym: endoglucanaza (xenlulaza hoặc endo-1,4- β -D-glucanaza, mã số EC 3.2.1.4) phân cắt một cách ngẫu nhiên ở các vị trí bên trong mạch xenluloza, xenlobiohydrolaza (1,4- β -xenlobiosidaza hoặc xenlobiohydrolaza, mã số EC 3.2.1.91) đóng vai trò như một exo-xenlulaza phân cắt ở các đầu khủ hoặc các

đầu không khử của mạch xenluloza và giải phóng sản phẩm chính xenlobioza, và β -glucosidaza (mã số EC 3.2.121) thủy phân xenlobioza thành glucoza. Ngoài ra, cần có hỗn hợp thích hợp chứa nhiều enzym bao gồm xylanaza (endo-1,4- β -xylanaza, mã số EC 3.2.1.8) là hemixenlulaza và các enzym phân giải thành tế bào thực vật khác.

Hiện nay, đã phân lập được chủng nấm sợi *Acremonium cellulolyticus* sản sinh xenlulaza thủy phân có hoạt lực cao, và hai gen mã hóa xenlobiohydrolaza, 3 gen mã hóa β -glucosidaza và 7 gen mã hóa endoglucanaza (xem, Tài liệu Patent 1). Endoglucanaza là một trong số các glycosit hydrolaza tham gia vào quá trình sản sinh monosacarit bằng cách phân cắt ngẫu nhiên và phân giải xenluloza hoặc lignoxenluloza như hemixenluloza.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu Patent 1: Đơn Công bố Patent chưa thẩm định Nhật Bản, số 2010-148427.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến enzym β -glucosidaza thu được từ nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*, polynucleotit mã hóa β -glucosidaza này, vector biểu hiện β -glucosidaza này, thể biến nạp chứa vector biểu hiện này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng β -glucosidaza này.

Từ kết quả nghiên cứu phát triển enzym xenlulaza thế hệ mới có hoạt tính mạnh, các tác giả sáng chế đã phân lập và xác định được gen mã hóa xenlulaza thế hệ mới từ nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*, nhờ đó thực hiện được sáng chế này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các phương án sau:

1. Enzym β -glucosidaza chứa miền xúc tác của β -glucosidaza bao gồm: (A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1; (B) polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1; hoặc (C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

2. Enzym β -glucosidaza theo phương án 1, trong đó enzym này có hoạt tính β -glucosidaza ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C và sử dụng cơ chất là p-nitrophenyl β -D-glucopyranosit.

3. Polynucleotit chứa vùng mã hóa miền xúc tác của enzym β -glucosidaza bao gồm: (a) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1; (b) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza; hoặc (c) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

4. Vectơ biểu hiện, trong đó vectơ này chứa polynucleotit theo phương án 3, và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza ở tế bào vật chủ.

5. Thể biến nạp chứa vectơ biểu hiện theo phương án 4.

6. Thể biến nạp theo phương án 5, trong đó thể biến nạp này là sinh vật nhân thật.

7. Thể biến nạp theo phương án 5, trong đó thể biến nạp này là nấm sợi.

8. Phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza bao gồm bước tạo ra polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza trong thể biến nạp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 5 đến 7.

9. Hỗn hợp xenlulaza chứa enzym β -glucosidaza theo phương án 1 hoặc 2 hoặc enzym β -glucosidaza thu được bằng phương pháp theo phương án 8, và ít nhất một loại xenlulaza khác.

10. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải xenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với β -glucosidaza theo phương án 1 hoặc 2 hoặc β -glucosidaza thu được bằng phương pháp theo phương án 8.

11. Phương pháp theo phương án 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với ít nhất một loại xenlulaza khác.

12. Phương pháp theo phương án 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

13. Phương pháp theo phương án 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm

bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12, endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13, và ít nhất một loại hemixenlulaza.

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế là enzym β -glucosidaza thể hệ mới thu được từ nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*. Do enzym này có hoạt tính hydrolaza đối với xenluloza, nên nó đặc biệt hữu dụng để dùng trong xử lý thủy phân sinh khối chứa xenluloza.

Ngoài ra, polynucleotit, vector biểu hiện chứa polynucleotit này, và thể biến nạp chứa vector biểu hiện theo sáng chế là hữu dụng để sản xuất enzym β -glucosidaza theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE của mẫu enzym β -glucosidaza (BGL) được mô tả ở Ví dụ 1.

Fig.2 thể hiện sắc ký đồ HPLC của dịch thủy phân thu được từ quá trình xử lý thân và lá cây ngô sau thu hoạch bằng chế phẩm enzym được mô tả ở ví dụ 1 với các phân đoạn thu được ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 10 phút đến 16 phút.

Fig.3 thể hiện sắc ký đồ HPLC của dung dịch phản ứng trước và sau khi thực hiện phản ứng enzym BGL được mô tả ở ví dụ 1 bằng cách sử dụng cơ chất là xenlobioza với các phân đoạn thu được ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 9 phút đến 15 phút.

Fig.4 thể hiện sắc ký đồ HPLC của dung dịch phản ứng trước và sau khi thực hiện phản ứng enzym BGL được mô tả ở ví dụ 1 bằng cách sử dụng cơ chất là xylobioza với các phân đoạn thu được ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 9 phút đến 15 phút.

Mô tả chi tiết sáng chế

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phân lập và xác định được gen mã hóa enzym β -glucosidaza thể hệ mới từ ANDbs (ADN bổ sung) được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược với khuôn là ARNtt (ARN thông tin) phân lập được từ nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*, gen này được viết tắt là gen *BGL*, và enzym β -glucosidaza được mã hóa bằng gen này được viết tắt là enzym *BGL*. Trình tự axit amin của *BGL* được thể hiện

trong SEQ ID NO.1, và trình tự bazơ mã hóa *BGL* (trình tự bazơ của vùng mang mã di truyền của gen *BGL*) được thể hiện trong SEQ ID NO.2.

Nhìn chung, ở protein có một số hoạt tính sinh học, thì một hoặc hoặc hai hoặc nhiều axit amin có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung mà không làm giảm hoạt tính sinh học của protein này. Theo đó, ở *BGL* một hoặc hai hoặc nhiều axit amin cũng có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung mà không làm giảm hoạt tính của β -glucosidaza.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến enzym β -glucosidaza chứa miền xúc tác của β -glucosidaza bao gồm một trong số các polypeptit từ (A) đến (C) được chỉ ra dưới đây:

(A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1;

(B) polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza; hoặc

(C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

Thuật ngữ “loại bỏ axit amin trên polypeptit” được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự loại bỏ (hoặc xóa bỏ) đoạn axit amin chứa polypeptit.

Thuật ngữ “thay thế axit amin trên polypeptit” được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự thay thế axit amin chứa polypeptit bằng một axit amin khác.

Thuật ngữ “bổ sung axit amin trên polypeptit” được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự chèn axit amin mới vào polypeptit.

Tốt hơn nữa, trong polypeptit ở mục (B) số lượng axit amin được loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 10 và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 5. Không có giới hạn cụ thể về vị trí của các axit amin được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung trên mỗi trình tự axit amin miễn là polypeptit này chứa trình tự axit amin trong đó các axit amin đã được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung vẫn duy trì được hoạt tính β -glucosidaza.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng của polypeptit ở mục (C) với trình tự

axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 miễn là polypeptit này có độ tương đồng với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn và nhỏ hơn 100%, tốt hơn nếu bằng 95% hoặc cao hơn và nhỏ hơn 100% và tốt hơn nữa nếu bằng 98% hoặc cao hơn và nhỏ hơn 100%.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa hai trình tự axit amin được xác định như sau: hai trình tự axit amin này được đặt cạnh nhau với các khoảng trống ở một số vị trí tính toán để chèn và loại bỏ sao cho số lượng các axit amin giống nhau lớn nhất có thể trùng khớp, và độ tương đồng trình tự được tính là tỷ lệ phần trăm của các axit amin trùng khớp so với toàn bộ các trình tự axit amin, không bao gồm các khoảng trống, theo cách sắp xếp thu được. Độ tương đồng trình tự giữa các trình tự axit amin có thể được xác định bằng các phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Độ tương đồng của các trình tự axit amin theo sáng chế được xác định dựa trên sự sắp xếp thu được từ chức năng trùng khớp tối đa của phần mềm tra cứu độ tương đồng, Genetyx Ver. 11.0.

Các polypeptit ở mục (B) và (C) có thể được thiết kế nhân tạo, hoặc cũng có thể là thể tương đồng của *BGL*, hoặc đoạn protein của nó.

Các polypeptit ở các mục từ (A) đến (C) có thể được tổng hợp tương ứng bằng phương pháp hóa học dựa trên trình tự axit amin này, hoặc cũng có thể được tổng hợp bằng hệ thống biểu hiện protein bằng cách sử dụng polynucleotit theo khía cạnh thứ hai của sáng chế được mô tả dưới đây. Ngoài ra, các polypeptit ở mục (B) và (C) cũng có thể được tổng hợp nhân tạo dựa trên polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen để chèn các đột biến axit amin vào.

Cơ chất của enzyme β -glucosidaza theo sáng chế là glucan chứa liên kết β -glucosit. Ví dụ về cơ chất của β -glucosidaza theo sáng chế bao gồm xenluloza tinh thể, carboxymetyl xenluloza (CMC), glucan chứa liên kết β -1,4 glucosit như xenlobioza, glucan chứa liên kết β -1,3 glycosit và liên kết β -1,4 glucosit, và glucan chứa liên kết β -1,6 glucosit như gentiobioza.

Enzyme β -glucosidaza theo sáng chế có hoạt tính β -glucosidaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng 30°C đến 60°C. Tốt hơn nếu, enzyme này có hoạt tính β -glucosidaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C, tốt hơn nữa nếu enzyme này có hoạt tính β -glucosidaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 80°C. Tốt hơn nếu

β -glucosidaza theo sáng chế có hoạt tính β -glucosidaza ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 25°C đến 70°C, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C, còn tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 45°C đến 70°C, và vẫn còn tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 55°C đến 65°C.

Thuật ngữ “hoạt tính β -glucosidaza” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hoạt tính sử dụng cơ chất là glucan chứa liên kết β -glycosit và tạo ra monosacarit bằng cách thủy phân cơ chất này.

Mặc dù thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ phản ứng, nhưng độ pH tối ưu của β -glucosidaza theo sáng chế nằm trong khoảng từ 2,0 đến 6,0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2,5 đến 5,0, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,0. Tốt hơn nếu, β -glucosidaza theo sáng chế có hoạt tính β -glucosidaza ở độ pH ít nhất nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,5, tốt hơn nếu ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 6,0, và tốt hơn nữa nếu ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 6,0.

Ngoài ra, enzym β -glucosidaza theo sáng chế còn có hoạt tính β -glucosidaza trong môi trường axit. Ví dụ, khi sử dụng cơ chất là PNPG, thì hoạt tính β -glucosidaza của β -glucosidaza theo sáng chế trong môi trường có độ pH = 3,0 mạnh hơn trong môi trường có độ pH = 5,5. Tốt hơn nếu, enzym β -glucosidaza theo sáng chế có hoạt tính phân giải PNPG ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C, tốt hơn nếu ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C, và còn tốt hơn nữa nếu ở độ pH nằm trong khoảng từ pH 2,5 đến 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 75°C.

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế cũng có thể có hoạt tính thủy phân xenluloza khác với hoạt tính β -glucosidaza. Ví dụ về các hoạt tính thủy phân xenluloza khác của β -glucosidaza theo sáng chế bao gồm hoạt tính xenlobiohydrolaza, hoạt tính endoglucanaza và hoạt tính xylanaza.

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế có thể chỉ chứa miền xúc tác của β -glucosidaza bao gồm một polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit ở các mục từ (A) đến (C) nêu trên, hoặc cũng có thể chứa các vùng khác. Ví dụ về các vùng khác này bao gồm các vùng khác với miền xúc tác đã biết của β -glucosidaza. Ví dụ, β -glucosidaza theo

sáng chế cũng có thể thu được bằng cách thay thế miền xúc tác đã biết của bằng polypeptit ở các mục từ (A) đến (C) nêu trên.

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế cũng có thể chứa peptit tín hiệu có khả năng vận chuyển nó đến vùng đặc hiệu để khu trú ở bên trong tế bào, hoặc peptit tín hiệu để bài tiết ra ngoài tế bào, ví dụ, ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của nó. Ví dụ về các peptit tín hiệu này bao gồm peptit tín hiệu mạng lưới nội chất, peptit tín hiệu vận chuyển nhân và peptit tín hiệu bài tiết. Việc bổ sung peptit tín hiệu vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của β -glucosidaza nêu trên cho phép nó được biểu hiện trong thể biến nạp để được bài tiết ở bên ngoài tế bào hoặc nằm trong màng lưới nội chất hoặc các vị trí khác trong tế bào.

Không có giới hạn cụ thể về peptit tín hiệu mạng lưới nội chất miễn là peptit này có khả năng giữ polypeptit bên trong mạng lưới nội chất, và peptit tín hiệu mạng lưới nội chất đã biết có thể được sử dụng thích hợp. Ví dụ về peptit tín hiệu mạng lưới nội chất bao gồm peptit tín hiệu chứa trình tự axit amin HDEL, hoặc các peptit tương tự.

Ngoài ra, các trình tự đánh dấu khác nhau có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của β -glucosidaza theo sáng chế, để có thể tinh chế dễ dàng và thuận tiện sau khi sản xuất enzym này bằng hệ thống biểu hiện. Ví dụ về các trình tự đánh dấu bao gồm các trình tự thường được sử dụng để biểu hiện hoặc tinh chế protein tái tổ hợp, như trình tự đánh dấu His, trình tự đánh dấu HA (hemagglutinin), trình tự đánh dấu Myc hoặc trình tự đánh dấu Flag.

Ngoài ra, β -glucosidaza theo sáng chế cũng có thể chứa các vùng chức năng khác miễn là hoạt tính β -glucosidaza thu được từ các polypeptit ở các mục từ (A) đến (C) nêu trên không bị suy giảm. Ví dụ về các vùng chức năng khác bao gồm vùng gắn kết xenluloza. Ví dụ về vùng gắn kết xenluloza bao gồm vùng gắn kết xenluloza được giữ bởi protein đã biết hoặc vùng gắn kết xenluloza đã được cải biến thích hợp.

Khi β -glucosidaza theo sáng chế chứa vùng chức năng khác với miền xúc tác của β -glucosidaza, vùng này có thể nằm ở phía trước (đầu tận cùng N) hoặc ở phía sau (đầu tận cùng C) so với miền xúc tác của β -glucosidaza. Ngoài ra, vùng chức năng khác và miền xúc tác của β -glucosidaza có thể được liên kết trực tiếp hoặc thông qua mối liên kết có chiều dài thích hợp.

Polynucleotit mã hóa enzym β -glucosidaza theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ nhất. Enzym β -glucosidaza này có thể được tạo ra bằng hệ thống biểu hiện là vật chủ được chèn vector biểu hiện chứa polynucleotit này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa vùng mã hóa miền xúc tác của enzym β -glucosidaza bao gồm một trình tự bazơ bất kỳ trong số các trình tự bazơ từ (a) đến (d) sau:

(a) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1;

(b) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza; hoặc

(c) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

Độ tương đồng giữa hai trình tự bazơ được xác định như sau: hai trình tự bazơ này được đặt cạnh nhau với các khoảng trống ở một số vị trí tính toán để chèn và loại bỏ sao cho số lượng các bazơ giống nhau lớn nhất có thể trùng khớp, và độ tương đồng trình tự được tính là tỷ lệ phần trăm của các bazơ trùng khớp so với toàn bộ các trình tự bazơ, không bao gồm các khoảng trống, theo cách sắp xếp thu được. Độ tương đồng giữa các trình tự bazơ có thể được xác định bằng các phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Độ tương đồng giữa các trình tự bazơ theo sáng chế được xác định dựa trên sự sắp xếp thu được từ chức năng trùng khớp tối đa của phần mềm tra cứu độ tương đồng, Genetyx Ver. 11.0.

Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” được dùng trong bản mô tả để chỉ, ví dụ, phương pháp thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: NATURE PROTOCOL (VOL. 1, No, 2, p. 518 to 525, công bố trực tuyến: 27/06/2006, doi:10.1038/nprot.2006.73). Ví dụ về các điều kiện này bao gồm các điều kiện để thực hiện quá trình lai hóa bằng cách nuôi cấy trong vài giờ đến qua đêm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 65°C trong dung

dịch đậm lai hóa SSC 6× (Thành phần của dung dịch SSC 20×: natri clorua 3M, dung dịch axit xitric 0,3M), dung dịch Denhardt 5× (Thành phần của dung dịch Denhardt 100×: 2% khối lượng albumin huyết thanh bò, 2% khối lượng ficoll, 2% khối lượng polyvinylpyrrolidon), dung dịch SDS 0,5% khối lượng, và ADN tinh trùng cá hồi 0,1mg/mL.

Trong các trình tự bazơ theo các mục từ (a) đến (c) nêu trên, tốt hơn nếu bộ ba phân giải có tần suất sử dụng cao ở vật chủ được chọn làm bộ ba phân giải. Ví dụ, trình tự bazơ theo mục (a) nêu trên có thể là trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc trình tự bazơ đã được cải biến bằng bộ ba có tần suất sử dụng cao ở vật chủ không làm biến đổi trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO.1). Các bộ ba này có thể được biến đổi bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết.

Polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể được tổng hợp hóa học dựa trên thông tin trình tự bazơ, hoặc có thể là vùng chứa miền xúc tác của β -glucosidaza trong gen *BGL* của nấm sợi *Acremonium cellulolyticus* từ tự nhiên được tổng hợp bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Toàn bộ gen *BGL* hoặc vùng chứa miền xúc tác của β -glucosidaza trong gen *BGL* có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng cách thu thập mẫu chứa *Acremonium cellulolyticus* từ tự nhiên, sử dụng khuôn là ADN bổ sung được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược từ khuôn là ARNtt thu được từ mẫu nấm sợi nêu trên, và thực hiện phản ứng PCR bằng cách sử dụng mỗi xuôi và mỗi ngược được thiết kế theo các phương pháp đã biết dựa trên trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.2.

Ví dụ, các polynucleotit có các trình tự bazơ theo mục (b), (c) hoặc (d) nêu trên có thể được tổng hợp nhân tạo bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung một hoặc hai hoặc nhiều bazơ trong polynucleotit có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.2.

Thuật ngữ “loại bỏ bazơ trên polynucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự loại bỏ (hoặc xóa bỏ) đoạn nucleotit chứa polypeptide.

Thuật ngữ “thay thế bazơ trên polynucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự thay thế bazơ chứa polynucleotit bằng một bazơ khác.

Thuật ngữ “bổ sung bazơ trên polynucleotit” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự chèn bazơ mới vào polynucleotit.

Polynucleotit theo sáng chế có thể chỉ chứa vùng mã hóa miền xúc tác của enzym β -glucosidaza, hoặc ngoài vùng mã hóa miền xúc tác của β -glucosidaza, polynucleotit theo sáng chế cũng có thể chứa vùng mã hóa một vùng chức năng khác như vùng gắn kết xenluloza, mối liên kết, các peptit tín hiệu, hoặc các trình tự đánh dấu khác nhau.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến vectơ biểu hiện chứa polynucleotit theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza ở tế bào vật chủ. Theo đó, vectơ biểu hiện này là vectơ trong đó polynucleotit theo sáng chế được kết hợp vào ở trạng thái có khả năng biểu hiện β -glucosidaza nêu trên.

Thuật ngữ “vectơ biểu hiện” được dùng trong bản mô tả để chỉ vectơ chứa ADN có vùng khởi đầu, ADN có trình tự để kết hợp ADN khác loài và ADN có vùng kết thúc bắt đầu từ đoạn trình tự nằm phía trước.

Cụ thể hơn, catxet biểu hiện chứa ADN có vùng khởi đầu, polynucleotit theo sáng chế, và ADN có vùng kết thúc cần để kết hợp vào vectơ biểu hiện này bắt đầu từ đoạn trình tự nằm phía sau. Polynucleotit theo sáng chế có thể được kết hợp vào vectơ biểu hiện này bằng các kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết. Kit tổng hợp vectơ biểu hiện có bán trên thị trường cũng có thể được sử dụng để kết hợp polynucleotit theo sáng chế vào vectơ biểu hiện này.

Vectơ biểu hiện này có thể được biến nạp vào sinh vật nhân sơ như *Escherichia coli* hoặc có thể được biến nạp vào sinh vật nhân thật như nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng đã nuôi cấy, tế bào động vật có vú đã nuôi cấy hoặc tế bào thực vật. Các vectơ biểu hiện tùy ý thường được sử dụng cho mỗi vật chủ có thể được sử dụng cho các vectơ biểu hiện này.

Tốt hơn nữa, vectơ biểu hiện theo sáng chế được biến nạp vào sinh vật nhân sơ hoặc vectơ biểu hiện được biến nạp vào sinh vật nhân thật như nấm men hoặc nấm sợi, tốt hơn nữa nếu vectơ biểu hiện theo sáng chế được biến nạp vào sinh vật nhân thật, còn tốt hơn nữa nếu vectơ biểu hiện theo sáng chế được biến nạp vào nấm sợi, và vẫn tốt hơn nữa nếu vectơ biểu hiện theo sáng chế được biến nạp vào nấm *Aspergillus*. Việc sử dụng hệ thống biểu hiện ở sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật có thể dễ dàng tạo ra

β -glucosidaza theo sáng chế với năng suất cao. Ngoài ra, do enzym β -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 vốn có sẵn trong nấm sợi *Acremonium cellulolyticus*, nên nó có thể được tổng hợp với các đặc tính giống hệt như của β -glucosidaza tự nhiên bằng cách biểu hiện β -glucosidaza bằng hệ thống biểu hiện của các sinh vật nhân thật như nấm sợi.

Tốt hơn nữa, ngoài polynucleotit theo khía cạnh thứ hai, vector biểu hiện theo sáng chế cũng chứa gen kháng thuốc. Do điều này sẽ giúp cho dễ dàng sàng lọc sinh vật chủ đã được biến nạp vector biểu hiện và sinh vật chủ chưa được biến nạp. Ví dụ về các gen kháng thuốc bao gồm gen kháng ampicilin, gen kháng kanamycin, gen kháng hygromycin, hoặc các gen kháng thuốc tương tự.

Thẻ biến nạp theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến thẻ biến nạp chứa vector biểu hiện theo khía cạnh thứ ba. Enzym β -glucosidaza theo sáng chế có thể được biểu hiện trong thẻ biến nạp này. Enzym β -glucosidaza theo sáng chế có thể được biểu hiện ở nhiều vật chủ như *Escherichia coli*, nấm men, nấm sợi hoặc lục lạp của thực vật bậc cao.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp được sử dụng để tạo ra thẻ biến nạp bằng cách sử dụng vector biểu hiện, và quá trình tổng hợp có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường được sử dụng để tạo ra thẻ biến nạp. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm phương pháp PEG (polyetylen glycol)-canxi, phương pháp *Agrobacterium*, phương pháp súng gen, phương pháp điện di, và các phương pháp tương tự. Trong số đó, khi vật chủ là nấm sợi, thì phương pháp PEG-canxi hoặc phương pháp *Agrobacterium* được ưu tiên.

Khi vật chủ là sinh vật nhân sơ, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng đã nuôi cấy hoặc tế bào động vật có vú đã nuôi cấy và các tế bào tương tự, thì thẻ biến nạp thu được theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng các phương pháp tương tự được sử dụng để nuôi cấy vật chủ này trước khi biến nạp.

Tốt hơn nữa, sinh vật nhân thật như nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng đã nuôi cấy hoặc tế bào động vật có vú đã nuôi cấy và các tế bào tương tự được sử dụng làm vật chủ chứa vector biểu hiện. Do các đột biến glycosyl hóa được thực hiện trên các protein ở sinh vật nhân thật, nên việc sử dụng thẻ biến nạp là sinh vật nhân thật có thể tạo ra

β -glucosidaza có độ ổn định nhiệt cao hơn so với việc sử dụng thể biến nạp là sinh vật nhân sơ. Đặc biệt, khi thể biến nạp là nấm sợi như là *Aspergillus* và sinh vật nhân thật như nấm sợi hoặc nấm men, thì có thể dễ dàng tạo ra được β -glucosidaza có độ ổn định nhiệt cao và năng suất lớn.

Trong thể biến nạp theo sáng chế, cat-xet để biểu hiện β -glucosidaza theo sáng chế thu được từ vector biểu hiện theo khía cạnh thứ ba có thể được kết hợp vào bộ gen hoặc có thể nằm độc lập ở bên ngoài bộ gen.

Phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza trong thể biến nạp nêu trên. Enzym β -glucosidaza theo sáng chế có thể được biểu hiện ổn định trong thể biến nạp được tạo ra bằng cách sử dụng vector biểu hiện trong đó polynucleotit theo khía cạnh thứ hai được kết hợp vào ở phía sau vùng khởi đầu không có khả năng kiểm soát tần suất biểu hiện và các yếu tố tương tự. Mặt khác, bằng cách thực hiện quá trình xử lý cảm ứng thích hợp trên thể biến nạp đã tạo ra vùng khởi đầu có thể cảm ứng biểu hiện theo hợp chất hoặc nhiệt độ cụ thể và các điều kiện tương tự, trong các điều kiện tương ứng để biểu hiện β -glucosidaza trong thể biến nạp mong muốn.

Không có giới hạn cụ thể về các phương pháp chiết xuất hoặc tinh chế β -glucosidaza từ thể biến nạp nêu trên miễn là phương pháp này không làm giảm hoạt tính của β -glucosidaza, và quá trình chiết xuất có thể được thực hiện theo phương pháp chiết xuất polypeptit thông thường từ các tế bào hoặc mô sinh học. Ví dụ về một phương pháp chiết xuất này bao gồm bước ngâm thể biến nạp nêu trên vào dung dịch đệm thích hợp để chiết xuất β -glucosidaza, sau đó phân tách dịch chiết và phần bã rắn. Tốt hơn nếu dung dịch đệm này chứa chất làm tăng độ tan như chất hoạt động bề mặt. Khi thể biến nạp là thực vật, thì thể biến nạp có thể được cắt hoặc nghiền sơ bộ trước khi ngâm vào dung dịch đệm. Ngoài ra, phương pháp phân tách rắn-lỏng đã biết có thể được sử dụng để phân tách dịch chiết và phần bã rắn, như phương pháp lọc, lọc nén, tách ly tâm, và thể biến nạp có thể được ép trong khi vẫn được ngâm trong dung dịch đệm chiết xuất. Enzym β -glucosidaza trong dịch chiết có thể được tinh chế bằng các phương pháp đã biết như kết tinh, siêu lọc hoặc sắc ký.

Khi β -glucosidaza theo sáng chế đã được biểu hiện ở trạng thái chứa peptit tín hiệu bài tiết trong thể biến nạp nêu trên, sau khi nuôi cấy thể biến nạp này, có thể dễ dàng và thuận tiện thu được dung dịch nuôi cấy chứa β -glucosidaza bằng cách thu hồi phần dịch nổi nuôi cấy từ canh trường thu được mà không chứa thể biến nạp. Ngoài ra, khi β -glucosidaza theo sáng chế chứa trình tự đánh dấu như trình tự đánh dấu His, có thể dễ dàng và thuận tiện tinh chế β -glucosidaza chứa trong dịch chiết hoặc phần dịch nổi nuôi cấy có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng trình tự đánh dấu này.

Tức là, phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo sáng chế bao gồm bước sản sinh β -glucosidaza trong thể biến nạp theo khía cạnh thứ tư, chiết xuất và tinh chế β -glucosidaza nêu trên từ thể tiếp hợp này, nếu muốn.

Hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề cập đến hỗn hợp xenlulaza chứa enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ nhất hoặc β -glucosidaza thu được bằng phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ năm, và ít nhất một loại xenlulaza khác. Enzym β -glucosidaza thu được bằng phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ năm có thể ở trạng thái nằm trong thể biến nạp theo sáng chế hoặc có thể được chiết xuất hoặc tinh chế từ thể biến nạp này. Glucan chứa liên kết β -1,4 glucosit như xenluloza có thể được phân giải một cách hiệu quả hơn bằng β -glucosidaza theo sáng chế ở dạng hỗn hợp với các xenlulaza khác.

Không có giới hạn cụ thể về xenlulaza khác với β -glucosidaza chứa trong hỗn hợp xenlulaza nêu trên miễn là nó có hoạt tính thủy phân xenluloza.

Ví dụ về các xenlulaza khác với β -glucosidaza theo sáng chế chứa trong hỗn hợp xenlulaza này bao gồm hemixenlulaza như xylanaza hoặc β -xylosidaza, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, hoặc các enzym tương tự. Tốt hơn nếu, hỗn hợp xenlulaza theo sáng chế chứa ít nhất một hemixenlulaza và xenlobiohydrolaza, và tốt hơn nữa nếu hỗn hợp này chứa cả hemixenlulaza lẫn xenlobiohydrolaza. Đặc biệt, tốt hơn nếu hỗn hợp này chứa ít nhất một hoặc nhiều xenlulaza được chọn từ nhóm bao gồm xylanaza, β -xylosidaza, endoglucanaza và xenlobiohydrolaza, và tốt hơn nữa nếu hỗn hợp này chứa toàn bộ các enzym xylanaza, β -xylosidaza, endoglucanaza và xenlobiohydrolaza.

Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza để thu được sản phẩm phân giải xenluloza bằng β -glucosidaza theo sáng chế. Cụ thể hơn, sản phẩm phân giải xenluloza được tạo ra bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với β -glucosidaza theo khía cạnh thứ nhất, thể biến nạp theo khía cạnh thứ tư hoặc β -glucosidaza thu được bằng phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ năm.

Không có giới hạn cụ thể về nguyên liệu chứa xenluloza miễn là nó chứa xenluloza. Ví dụ về nguyên liệu này bao gồm sinh khối xenluloza như cỏ hoặc chất thải nông nghiệp và giấy đã qua sử dụng. Tốt hơn nữa, nguyên liệu chứa xenluloza được xử lý cơ học như nghiền hoặc băm nhỏ, xử lý hóa học như xử lý bằng axit hoặc kiềm, hoặc xử lý ngâm hoặc hòa tan vào dung dịch đệm thích hợp trước khi cho tiếp xúc với β -glucosidaza theo sáng chế.

Các điều kiện của phản ứng thủy phân xenluloza bởi β -glucosidaza theo sáng chế là các điều kiện cho phép enzym này thể hiện được hoạt tính của β -glucosidaza. Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0 và tốt hơn nữa nếu phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 55°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Thời gian của phản ứng thủy phân xenluloza được điều chỉnh một cách thích hợp theo nhiều yếu tố như loại nguyên liệu chứa xenluloza cần thủy phân, phương pháp xử lý sơ bộ hoặc lượng nguyên liệu được sử dụng. Ví dụ, phản ứng thủy phân xenluloza có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 phút đến 12 giờ.

Ngoài β -glucosidaza theo sáng chế, tốt hơn nếu ít nhất một loại xenlulaza khác được sử dụng trong phản ứng thủy phân xenluloza. Các xenlulaza giống như các enzym chứa trong hỗn hợp xenlulaza nêu trên có thể được sử dụng làm các xenlulaza khác này, và tốt hơn nếu các enzym này là xenlulaza ổn định nhiệt, có hoạt tính ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Ngoài ra, hỗn hợp xenlulaza theo khía cạnh thứ sáu có thể được sử dụng trong phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza thay cho β -glucosidaza theo khía cạnh thứ nhất, thể biến nạp theo khía cạnh thứ tư, hoặc β -glucosidaza thu được bằng phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza theo khía cạnh thứ năm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây, tuy nhiên phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

(1) Thiết kế vector biểu hiện *Aspergillus* BGL

Chiết xuất ADN bộ gen của *Acremonium Cellulolyticus*

Chủng *Acremonium cellulolyticus* H1 (do International Patent Organism Depository of the National Institute of Technology and Evaluation cung cấp, số truy cập: FERM BP-11508, được ký hiệu là “chủng H1”) được cấy vào môi trường thạch PDB (môi trường đĩa thạch được điều chế bằng cách bổ sung 1,5% (kl/tt) agarosa vào môi trường PDA (bằng cách sử dụng canh trường Difco PDA)), sau đó nuôi cấy trong 1 tuần ở nhiệt độ 30°C. Các tế bào nấm thu được được cấy vào môi trường PDA sau khi cắt các đĩa thạch chứa các tế bào đã có đường kính bằng 5mm, tiếp theo nuôi cấy lác ở nhiệt độ 30°C và tốc độ lác bằng 130 vòng/phút. Thu lấy các tế bào nấm bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy trong 10 phút ở tốc độ bằng 15000 vòng/phút và rửa hai lần bằng môi trường PDA.

Các hạt từ được nạp vào ống nhựa có dung tích 2mL chứa mẫu tế bào nấm nêu trên, và mẫu tế bào nấm này được nghiền ba lần, mỗi lần trong 90 giây bằng máy nghiền bi (tên thiết bị: Shake Master, Bio-Medical Science Co., Ltd.), sau đó chiết xuất ADN bằng kit Nucleon (Amersham Corp.).

Giải trình tự ADN bộ gen của *Acremonium cellulolyticus* BGL

Trình tự mã hóa *BGL* (SEQ ID NO.3) được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là ADN bộ gen thu được nêu trên và đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.4, đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.5 được thể hiện trong Bảng 1, và ADN polymeraza (nhãn hiệu: KOD-Plus, Toyobo Co., Ltd.). Phản ứng PCR bao gồm một chu kỳ thực hiện trong 2 phút ở nhiệt độ 94°C, 30 chu kỳ trong 20 giây ở nhiệt độ 96°C, trong 30 giây ở nhiệt độ 60°C và trong 5 phút ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR được tinh chế bằng Kit QIAquick PXR (Qiagen Inc.).

Giải trình tự ADN bổ sung của *Acremonium Cellulolyticus* BGL

Các tế bào nấm được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong phần Chiết xuất ADN bộ gen của *Acremonium Cellulolyticus*. Tiếp theo, các hạt từ được nạp vào ống nhựa có dung tích 2mL chứa mẫu tế bào nấm nêu trên, và mẫu tế bào nấm này được nghiền ba lần, mỗi lần trong 90 giây bằng máy nghiền bi (tên thiết bị: Shake Master, Bio-Medical Science Co., Ltd.), sau đó chiết xuất ARN bằng kit Isogen II (Nippon Gene Co., Ltd.). ADN bổ sung được tổng hợp từ ARN chiết xuất được bằng kit tổng hợp ADN bổ sung (nhãn hiệu: SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech Laboratories, Inc.). ADN bổ sung thu được được giải trình tự và trình tự thu được (SEQ ID NO.2) được so sánh với trình tự ADN bộ gen của *Acremonium Cellulolyticus* (SEQ ID NO.3) để xác định các đoạn intron.

Tổng hợp vector E. coli pBR-niaD chứa gen niaD

Phản ứng PCR được thực hiện theo cùng cách thức để khuếch đại ADN bổ sung mã hóa BGL, khác biệt ở chỗ sử dụng khuôn là ADN bổ sung bộ gen của chủng *Aspergillus oryzae* RIB40 (do National Institute of Technology and Evaluation cung cấp, mã NBRC: 100959, được ký hiệu là “chủng RIB40”), đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.6 và đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.7 được thể hiện trong Bảng 1 để khuếch đại ADN bổ sung chứa gen niaD mã hóa nitrat reductaza thu được từ *Aspergillus oryzae*.

Sau khi phân cắt sản phẩm khuếch đại PCR thu được và plasmit pBR322 của *E.coli* (Takara Bio Inc.) bằng các enzym giới hạn *AvaI* và *NdeI* ở nhiệt độ 37°C, các sản phẩm phân cắt được phân tách bằng cách điện di trên gel agarosa, và băng đích được cắt, sau đó chiết xuất và tinh chế từ mảnh gel này bằng Kit chiết xuất gel QIAquick (Qiagen Inc.) để thu được các đoạn ADN bổ sung đã được cắt bằng enzym giới hạn của plasmit pBR322 và gen niaD. Sau đó, các đoạn ADN này được nối với nhau bằng Kit nối ADN (Takara Bio Inc.) và các đoạn ADN này được biến nạp vào chủng *E.coli* JM109 (được ký hiệu là “chủng JM109”). Kết quả, thu được thể biến nạp chứa plasmit pBR-niaD (plasmit chứa đoạn ADN bổ sung của gen niaD được chèn ở giữa các đoạn được cắt bằng các enzym giới hạn *AvaI* và *NdeI* của plasmit pBR322).

Biến nạp vùng kết thúc *agdA* vào pBR-niaD

Phản ứng PCR được thực hiện theo cùng cách thức để khuếch đại ADN bổ sung

mã hóa *BGL*, khác biệt ở chỗ sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng *Aspergillus oryzae* RIB40, đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.8 và đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.9 được thể hiện trong Bảng 1 để khuếch đại ADN bổ sung chứa vùng kết thúc của gen *agdA* thu được từ *Aspergillus* (cũng được gọi là “vùng kết thúc *agdA*”).

Sau khi phân cắt sản phẩm khuếch đại PCR thu được và plasmit pBR-niaD bằng các enzym hạn chế *Sall* và *AvaI* ở nhiệt độ 37°C, thu được các đoạn ADN bổ sung đã được cắt bằng enzym giới hạn của pBR-niaD và vùng kết thúc *agdA* từ sản phẩm phân cắt này theo cách thức giống như quy trình tổng hợp plasmit pBR-niaD nêu trên, và các đoạn ADN này được liên kết với nhau và biến nạp vào chủng JM109 được. Kết quả, thu được thể biến nạp chứa plasmit pBR-agdAT-niaD (plasmit chứa đoạn ADN bổ sung của vùng kết thúc *agdA* được chèn ở giữa các đoạn được cắt bằng các enzym giới hạn *Sall* và *AvaI* của pBR322-niaD).

Biến nạp vùng khởi đầu *enoA* vào pBR-agdAT-niaD

Phản ứng PCR được thực hiện theo cùng cách thức để khuếch đại ADN bổ sung mã hóa *BGL*, khác biệt ở chỗ sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng *Aspergillus oryzae* RIB40, đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.10 và đoạn môi có trình tự bazơ như nêu trong SEQ ID NO.11 được thể hiện trong Bảng 1 để khuếch đại ADN bổ sung chứa vùng khởi đầu của gen *enoA* thu được từ *Aspergillus* (cũng được gọi là “vùng khởi đầu *enoA*”).

Sau khi phân cắt sản phẩm khuếch đại PCR thu được và plasmit pBR-agdAT-niaD bằng các enzym hạn chế *NheI* và *Sall* ở nhiệt độ 37°C, thu được các đoạn ADN bổ sung đã được cắt bằng enzym giới hạn của plasmit pBR-agdAT-niaD và vùng khởi đầu *enoA* từ sản phẩm phân cắt này theo cách thức giống như quy trình tổng hợp plasmit plasmit pBR-niaD nêu trên, các đoạn ADN này được liên kết với nhau và biến nạp vào chủng JM109. Kết quả, thu được thể biến nạp chứa plasmit pBR-enoAP-agdAT-niaD (plasmit chứa đoạn ADN bổ sung của vùng khởi đầu *enoA* được chèn ở giữa các đoạn được cắt bằng các enzym giới hạn *NheI* và *Sall* của plasmit pBR322-agdAT-niaD).

Bảng 1

SEQ ID NO.	Trình tự bazơ
4	TCCTCCAAGTTACCCATGGTTCGGTCAACG
5	CGCTTCGTCGACCCCTTACAGCAACGTCAA
6	ATGCTCGGGAGCTTTGGATTTCCTACGTCTTC
7	ATGCATATGTCGAGAGTGTGTGTGGGTCAACG
8	ATGGTCGACGAAGCGTAACAGGATAGCCTAGAC
9	ATGCCCCGAGAGTAACCCATTCCCGGTTCTCTAG
10	ATGGCTAGCAGATCTCGCGGCAGGGTTGAC
11	ATGGTCGACCCCGGGTAACCTTGGAGGACGGAAGAAAAGAG

Biến nạp AND bộ gen BGL vào pBR-enoAP-agdAT-niaD

Trước tiên, sau khi phân cắt plasmit pBR-enoAP-agdAT-niaD bằng enzym giới hạn Sall ở nhiệt độ 30°C, thu được đoạn pBR-enoAP-agdAT-niaD được xử lý bằng SmaI từ sản phẩm phân cắt này theo cách thức giống như quy trình tổng hợp plasmit pBR-niaD nêu trên.

Đoạn đã xử lý bằng SmaI này và trình tự *AND bộ gen* mã hóa *BGL* được tinh chế theo cách thức nêu trên được liên kết với nhau bằng cách sử dụng Kit tách dòng In-Fusion™ HD (Clontech Laboratories, Inc.) để thu được plasmit pBR-enoAP-BGL-adgAT-niaD (vector biểu hiện *Aspergillus oryzae BGL*), và biến nạp plasmit này vào các tế bào có khả năng sao chép hoàn toàn (Clontech Laboratories, Inc.) để thu được thể biến nạp *E.coli BGL*. Thể biến nạp này được nuôi cấy lắc qua đêm ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 180 vòng/phút trên môi trường LB chứa 100µg/mL ampicilin, và thu được plasmit pBR-enoAP-BGL-agdAT-niaD với số lượng lớn từ môi trường nuôi cấy nêu trên bằng cách sử dụng Kit QIAquick Miniprep (Qiagen Inc.).

(2) Sản xuất thể biến nạp *Aspergillus* chứa vector biểu hiện *Aspergillus BGL*

Plasmit pBR-enoAP-BGL-agdAT-niaD nêu trên được biến nạp vào chủng *Aspergillus oryzae* D300 (do National Institute of Technology and Evaluation cung cấp) bằng phương pháp PEG-canxi (Mol. Gen. Genet., Vol. 218, pp. 99-104 (1989)). Thể biến nạp (chủng *Aspergillus BGL* đã biến nạp) được sàng lọc trên môi trường Czapek-Dox (3% (kl/tt) dextrin, 0,1% (kl/tt) kali dihydro phosphat, 0,2% (kl/tt) kali clorua, 0,05% (kl/tt) magie sulfat, 0,001% (kl/tt) sắt sulfat và 0,3% (kl/tt) natri nitrat).

(3) Tổng hợp BGL từ chủng *Aspergillus BGL* đã biến nạp

Chủng *Aspergillus BGL* đã biến nạp được nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox

để tạo bào tử, sau đó thu lấy các bào tử bằng nước vô trùng. Các bào tử này được cấy vào bình nón có dung tích 500mL chứa 100mL môi trường PD (2% (kl/tt) dextrin, 1% (kl/tt) polypepton, 0,1% (kl/tt) axit amin casein, 0,5% (kl/tt) kali dihydro phosphat, 0,05% (kl/tt) magie sulfat và 0,1% (kl/tt) natri nitrat) đến mật độ cuối cùng bằng 1×10^4 /mL. Sau khi nuôi cấy trong 3 ngày ở nhiệt độ 30°C, sản phẩm gen mong muốn (BGL) được bài tiết và xuất hiện trong môi trường nuôi cấy. Dịch lỏng thu được sau khi nuôi cấy được sử dụng làm mẫu enzym.

BGL trong mẫu enzym được xác định bằng phân tích SDS-PAGE. Quá trình điện di SDS của mẫu enzym này được thực hiện bằng cách sử dụng gel Mini-Gradient với gradient nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 20% (Atto Corp.). Mẫu enzym và dung dịch xử lý mẫu Tris-SDS β -ME (Atto Corp.) được trộn ở tỷ lệ 1:1, sau đó xử lý trong 5 phút ở nhiệt độ 100°C và tiến hành điện di với 20 μ L hỗn hợp. Sau khi kết thúc quá trình điện di, gel cố định được nhuộm bằng EzStain Aqua (Atto Corp.) để hiển thị các băng protein. Sau đó, hình ảnh gel được chụp bằng hệ thống ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad Inc.). Hình ảnh gel này được phân tích bằng phần mềm Image Lab 2.0, sau đó định lượng protein.

Fig.1 thể hiện kết quả phân tích mẫu enzym (BGL) bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Băng bên trái là gen chỉ thị trọng lượng phân tử protein và băng bên phải là mẫu enzym. Kết quả phân tích cho thấy mẫu enzym thu được chứa BGL có trọng lượng phân tử xấp xỉ bằng 120 kDa.

(4) Đánh giá hoạt tính enzym

Hoạt tính enzym được tính theo đơn vị (U). 1 U được xác định theo phương trình dưới đây và được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1 μ mol sản phẩm từ cơ chất trong thời gian 1 phút.

$$1 \text{ U } (\mu\text{mol/phút}) = [\text{lượng đường tạo thành } (\mu\text{mol/L})] \times [\text{thể tích dung dịch phản ứng (L)}] / [\text{thời gian phản ứng (phút)}]$$

Ngoài ra, hoạt tính riêng tính trên 1mg protein được xác định bằng phương trình sau:

$$\text{Hoạt tính riêng (U/mg)} = [\text{hoạt tính tính theo đơn vị (U)}] / [\text{lượng protein (mg)}]$$

Đánh giá hoạt tính phân giải CMC

CMC (Sigma-Aldrich Corp.) được sử dụng làm cơ chất chuẩn. Ngoài ra, đường chuẩn được xây dựng từ các giá trị thu được của năm dung dịch pha loãng liên tiếp (0,5mM đến 7,5mM) được điều chế bằng cách pha loãng thích hợp dung dịch glucoza 10mM (mmol/L) bằng dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5).

Cụ thể, chuẩn bị các ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL với số lượng bằng với số lượng mẫu cần đo, và điều chế các dung dịch chuẩn bằng cách bổ sung 190 μ L dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) và 200 μ L dung dịch CMC 1% (kl/tt) (dung môi là dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5)) vào mỗi ống, sau đó trộn kỹ ở nhiệt độ 30°C. Tiếp theo, 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào mỗi ống để kích hoạt phản ứng enzym, và sau 15 phút kể từ lúc bắt đầu phản ứng, 400 μ L dung dịch DNSA (axit đinitrosalixylic) được bổ sung vào và khuấy trộn để dừng phản ứng, sau đó đun sôi trong 5 phút ở nhiệt độ 100°C và làm lạnh bằng nước đá. Sau đó, 100 μ L dung dịch phản ứng được lấy ra từ mỗi ống, tiếp theo pha loãng bằng 100 μ L nước cất và đo độ hấp thụ của các dung dịch thu được ở bước sóng 540nm (A540). Trong quá trình đo độ hấp thụ, mẫu trắng là mẫu được chuẩn bị theo cùng cách thức chỉ khác là bổ sung dung dịch đệm axit axetic 20mM (pH = 5,5) thay cho mẫu enzym. Nồng độ glucoza được xác định từ các trị số độ hấp thụ A540 đo được và đường chuẩn, và hoạt tính riêng được xác định theo phương trình dưới đây:

$$\text{Hoạt tính riêng (U/mg)} = ([\text{nồng độ glucoza (mmol/L)}] \times 15 \times 0,400/0,010)/([15 \times \text{[lượng protein (mg)]}])$$

Đánh giá hoạt tính phân giải xylan

Xylan hòa tan được sử dụng làm cơ chất chuẩn. 1g xylan có nguồn gốc từ cây bạch dương (Sigma Corp.) được trộn với 100mL nước, sau khi gia nhiệt hỗn hợp thu được trong 2 giờ ở nhiệt độ 100°C, phần rắn được loại bỏ và chỉ thu lấy phần lỏng, tiếp đó làm khô để thu được chất rắn xylan hòa tan. Ngoài ra, đường chuẩn được xây dựng từ các giá trị thu được của năm dung dịch pha loãng liên tiếp (0,5mM đến 3,0mM) được điều chế bằng cách pha loãng thích hợp dung dịch xyloza 10mM dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5).

Cụ thể, chuẩn bị các ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL với số lượng bằng với số lượng mẫu cần đo, và điều chế các dung dịch chuẩn bằng cách bổ sung 180 μ L dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) và 200 μ L dung dịch xylan hòa tan 1% (kl/tt) (dung môi là dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5)) vào mỗi ống, sau đó trộn kỹ ở nhiệt độ 30°C. Tiếp theo, 20 μ L mẫu enzym được bổ sung vào mỗi ống để kích hoạt phản ứng enzym, và sau 15 phút kể từ lúc bắt đầu phản ứng, 400 μ L dung dịch DNSA được bổ sung vào và khuấy trộn để dừng phản ứng, sau đó đun sôi trong 5 phút ở nhiệt độ 100°C và làm lạnh bằng nước đá. Sau đó, 100 μ L dung dịch phản ứng được lấy ra từ mỗi ống, sau đó pha loãng bằng 100 μ L nước cất và đo độ hấp thụ của các dung dịch thu được ở bước sóng 540nm (A540). Trong quá trình đo độ hấp thụ, mẫu trắng là mẫu được chuẩn bị theo cùng cách thức chỉ khác là bổ sung dung dịch đệm axit axetic 20mM (pH = 5,5) thay cho mẫu enzym. Nồng độ xyloza được xác định từ các trị số độ hấp thụ A540 đo được và đường chuẩn, và hoạt tính riêng được xác định theo phương trình dưới đây:

$$\text{Hoạt tính riêng (U/mg)} = ([\text{nồng độ xyloza (mmol/L)}] \times 15 \times 0,400/0,020)/([15 \times [\text{lượng protein (mg)}]])$$

Đánh giá hoạt tính phân giải PNPG

PNPG (p-nitrophenyl β -D-glucopyranosit, do Sigma-Aldrich Corp. cung cấp) được sử dụng làm cơ chất chuẩn. Hoạt tính phân giải PNPG được sử dụng chủ yếu để đánh giá hoạt tính của β -glucosidaza. Ngoài ra, đường chuẩn được xây dựng từ các giá trị thu được của năm dung dịch pha loãng liên tiếp (0 μ M đến 200 μ M) được điều chế bằng cách pha loãng thích hợp dung dịch PNP (p-nitrophenol) 1000 μ mol/L bằng dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5).

Cụ thể, chuẩn bị các ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL với số lượng bằng với số lượng mẫu cần đo, và điều chế các dung dịch chuẩn bằng cách bổ sung 615 μ L dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) và 50 μ L dung dịch PNPG (3,4mM, dung môi là nước siêu tinh khiết) vào mỗi ống, sau đó trộn kỹ ở nhiệt độ 30°C. Tiếp theo, 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào mỗi ống để kích hoạt phản ứng enzym, và sau 15 phút kể từ lúc bắt đầu phản ứng, 625 μ L dung dịch nước natri carbonat 0,2M được bổ sung vào và khuấy trộn để dừng phản ứng. Sau đó, 200 μ L dung dịch phản ứng được lấy ra từ mỗi ống, và đo độ hấp

thụ ở bước sóng 420nm (A420). Trong quá trình đo độ hấp thụ, mẫu trắng là mẫu được chuẩn bị theo cùng cách thức chỉ khác là bổ sung dung dịch đệm axit axetic 20mM (pH = 5,5) thay cho mẫu enzyme. Nồng độ PNP được xác định từ các trị số độ hấp thụ A420 đo được và đường chuẩn, và hoạt tính riêng được xác định theo phương trình dưới đây:

$$\text{Hoạt tính riêng (U/mg)} = ([\text{Nồng độ PNP } (\mu\text{mol/L})] \times 0,001 \times 0,675/0,01)/(15 \times [\text{lượng protein (mg)}])$$

Bảng 2

	BGL
Hoạt tính phân giải CMC (U/mg)	0,76
Hoạt tính phân giải Xylan (U/mg)	0,76
Hoạt tính phân giải PNPG (U/mg)	3,08

Bảng 2 thể hiện kết quả đánh giá hoạt tính phân giải CMC, hoạt tính phân giải xylan và hoạt tính phân giải PNPG (hoạt tính riêng) của BGL được tạo ra từ chủng *Aspergillus* BGL đã biến nạp. Kết quả phân tích cho thấy BGL này có hoạt tính phân giải PNPG, hoạt tính phân giải xylan và hoạt tính phân giải CMC, trong đó hoạt tính phân giải PNPG cao gấp 4 lần hoạt tính phân giải xylan và hoạt tính phân giải CMC tính theo hoạt tính riêng. Các kết quả này cũng chứng tỏ rằng BGL thu được có hoạt tính β -glucosidaza.

(5) Đánh giá hoạt tính thủy phân

Các chế phẩm enzyme được sử dụng để đánh giá chứa mẫu enzyme (BGL) được điều chế theo phần (3) nêu trên, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12, endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13, xylanaza (endo-1,4-beta-xylanaza A thu được từ *Thermoascus aurantiacus*, Số truy cập GenBank: AAF24127) và β -xylosidaza (β -xylosidaza thu được từ *Thermotoga maritima*, do Thermostable Enzyme Laboratory Co., Ltd. cung cấp).

Trước tiên, dung dịch nước amoniac 25% (kl/tt) được trộn với sinh khối chứa lignoxenluloza ở dạng thân và lá cây ngô sau thu hoạch đã được nghiền mịn đến tỷ lệ khối lượng bằng 1:2,5 để thu được hỗn hợp cơ chất chứa thân và lá cây ngô sau thu hoạch và dung dịch nước amoniac. Tiếp theo, hỗn hợp cơ chất này được để thủy phân sơ bộ trong 8 giờ ở nhiệt độ 80°C, sau đó phân tách amoniac và điều chỉnh độ pH đến pH = 4,5. Tiếp theo, hàm lượng sinh khối được điều chỉnh đến 20% khối lượng để thu được sản phẩm thủy phân sơ bộ sử dụng trong ví dụ này. Chế phẩm enzyme chứa BGL được bổ

sung vào sản phẩm thủy phân sơ bộ này đến nồng độ enzym cuối cùng tính trên 1g sinh khối bằng 4,5mg/g (thân và lá cây ngô sau thu hoạch) và để phản ứng trong 3 ngày ở nhiệt độ 50°C. Trong quá trình phản ứng, hỗn hợp được lắc bằng máy lắc ở tốc độ bằng 160 vòng/phút. Ngoài ra, hỗn hợp enzym thủy phân có nguồn gốc từ loài *Acremonium* có bán trên thị trường (nhãn hiệu: Acremonium Xenlulaza, Meiji Seika Pharma Co., Ltd.) được sử dụng làm mẫu đối chứng và để phản ứng theo cùng cách thức.

Sau khi kết thúc phản ứng, dịch thủy phân thu được được chuyển vào ống lấy mẫu và ly tâm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C với lực ly tâm bằng $15760 \times g$. Phần dịch nổi thu được được chuyển vào ống nhựa sạch có dung tích 1,5mL, và sau khi gia nhiệt trong 5 phút ở nhiệt độ 95°C, được ly tâm trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C với lực ly tâm bằng $15760 \times g$. Sau khi phần dịch nổi thu được được chuyển một lần nữa vào ống nhựa sạch có dung tích bằng 1,5mL, phần dịch nổi được lọc bằng màng lọc 0,2 μ m (đường kính 13mm). chuyển 0,2mL dịch lọc vào bình phản ứng, sau đó định lượng nồng độ đường bằng phương pháp HPLC ở các điều kiện được chỉ ra dưới đây. Glucoza và xyloza (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) lần lượt được sử dụng làm chất chuẩn cho hệ thống HPLC.

Thiết bị đo nồng độ đường; Thiết bị phân tách: Waters 2695 (Waters Corp.).

Bộ phận phát hiện hồng ngoại (RI): Waters 2414 (Waters Corp.).

Cột: Bio-Rad HPX-87P (Bio-Rad Inc.).

Điều kiện đo nồng độ đường:

Dung môi rửa giải: Nước siêu tinh khiết.

Tốc độ dòng: 0,6 mL/phút.

Nhiệt độ cột: 85°C.

Nhiệt độ bộ phận phát hiện: 40°C.

Fig.2 thể hiện sắc ký đồ HPLC của dịch thủy phân thu được từ mỗi phản ứng được phát hiện bằng bộ phận phát hiện hồng ngoại với các phân đoạn thu được ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 10 phút đến 16 phút, tại đó các disaccarit và monosaccarit được rửa giải. Trên sắc ký đồ này, ký hiệu “enzym được bổ sung” thể hiện kết quả phân tích của dịch thủy phân thu được sau khi bổ sung chế phẩm enzym nêu trên và ký hiệu “enzym

không được bổ sung” thể hiện kết quả phân tích của dịch thủy phân được xử lý theo cùng cách thức nhưng không bổ sung chế phẩm enzym nêu trên.

Kết quả định lượng cho thấy trái ngược với nồng độ đường của dịch thủy phân (tổng nồng độ của glucoza và xyloza) khi sử dụng hỗn hợp enzym thủy phân có bán trên thị trường bằng khoảng 2,92% khối lượng, thì trị số này khi sử dụng chế phẩm enzym chứa BGL theo sáng chế bằng khoảng 3,53% khối lượng, tức là lượng đường được tạo ra lớn hơn gấp 1,2 lần. Các kết quả này chứng tỏ rằng việc sử dụng kết hợp BGL với các enzym thủy phân khác sẽ thu được hỗn hợp enzym có hoạt tính thủy phân cao hơn so với hỗn hợp enzym thủy phân có nguồn gốc từ *Acremonium* có bán trên thị trường.

(6) Đánh giá hoạt tính của enzym

Đánh giá hoạt tính phân giải xenlobioza

Hoạt tính phân giải xenlobioza và hoạt tính phân giải xylobioza được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu enzym được điều chế theo phần (3) nêu trên.

Cụ thể, 200 μ L dung dịch nước xenlobioza 0,03M và 190 μ L dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) được bổ sung tương ứng vào hai ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL và trộn kỹ, sau đó ủ sơ bộ trong 5 phút ở nhiệt độ 30°C. Sau khi ủ sơ bộ, 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào một trong số 2 ống nhựa này để hoạt hóa phản ứng enzym. Sau 90 phút tính từ khi bắt đầu phản ứng, dung dịch trong ống nhựa này được gia nhiệt trong 5 phút ở nhiệt độ 95°C để dừng phản ứng enzym (thời gian phản ứng enzym: 90 phút). 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào ống nhựa còn lại, ngay sau đó gia nhiệt dung dịch trong ống nhựa này trong 5 phút ở nhiệt độ 95°C để dừng phản ứng enzym (thời gian phản ứng enzym: 0 phút).

Ngoài ra, 200 μ L dung dịch nước xylobioza 0,014M và 190 μ L dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) được bổ sung tương ứng vào hai ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL và trộn kỹ, sau đó ủ sơ bộ trong 5 phút ở nhiệt độ 30°C, và tiếp theo 100 μ L mẫu enzym được bổ sung vào ống nhựa này để hoạt hóa phản ứng enzym. Sau khi ủ sơ bộ, 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào một trong số 2 ống nhựa này để hoạt hóa phản ứng enzym. Sau 90 phút tính từ khi bắt đầu phản ứng, dung dịch trong ống nhựa này được gia nhiệt trong 5 phút ở nhiệt độ 95°C để dừng phản ứng enzym (thời gian phản ứng enzym:

90 phút). 10 μ L mẫu enzym được bổ sung vào ống nhựa còn lại, ngay sau đó gia nhiệt dung dịch trong ống nhựa này trong 5 phút ở nhiệt độ 95°C để dừng phản ứng enzym (thời gian phản ứng enzym: 0 phút).

Sau khi kết thúc các phản ứng, bốn ống nhựa này được ly tâm trong 5 phút với lực ly tâm bằng $15760 \times g$. Sau khi chuyển phần dịch nổi thu được vào ống nhựa có dung tích bằng 1,5mL, phần dịch nổi này được lọc bằng màng lọc 0,2 μ m (đường kính bằng 13mm). 0,2 mL dịch lọc được chuyển vào bình phản ứng, nồng độ đường được định lượng bằng phương pháp HPLC ở cùng điều kiện như phần (5) nêu trên, và hoạt tính riêng tính trên đơn vị khối lượng (U/mg) được xác định theo phương trình dưới đây. Glucoza và xyloza (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) lần lượt được sử dụng làm chất chuẩn cho hệ thống HPLC.

$$[\text{Hoạt tính riêng (U/mg)}] = ([\text{nồng độ glucoza } (\mu\text{mol/L})] \times 0,4/0,01)/(90 \times [\text{lượng protein (mg)}])$$

Fig.3 và Fig.4 thể hiện các sắc ký đồ HPLC của các dịch thủy phân thu được từ mỗi phản ứng được phát hiện bằng bộ phận phát hiện hồng ngoại với các phân đoạn thu được ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 9 phút đến 15 phút, tại đó các disaccarit và monosaccarit được rửa giải. Fig.3 là sắc ký đồ của các dung dịch phản ứng enzym với cơ chất là xenlobiozae, trong khi đó Fig.4 là sắc ký đồ của các dung dịch phản ứng enzym với cơ chất là xylobioza.

Như được thể hiện trên Fig.3, khi sử dụng cơ chất là xenlobioza, nếu thực hiện phép so sánh giữa dịch thủy phân khi thời gian phản ứng bằng 0 phút (ký hiệu “trước phản ứng” trên sắc ký đồ) và dịch thủy phân khi thời gian phản ứng bằng 90 phút (ký hiệu “sau phản ứng” trên sắc ký đồ), thì pic sắc ký quan sát được đối với xenlobioza có thời gian lưu xấp xỉ bằng 11 phút đối với dịch thủy phân sau phản ứng là nhỏ hơn so với dịch thủy phân trước phản ứng, trong khi đó pic sắc ký quan sát được đối với glucoza có thời gian lưu xấp xỉ bằng 13,3 phút là lớn hơn, điều này chứng tỏ rằng xenlobioza đã được phân giải thành glucoza bởi BGL theo sáng chế. Hoạt tính riêng phân giải xenlobioza của BGL theo sáng chế bằng 0,21 U/mg.

Mặt khác, như được thể hiện trên Fig.4, khi sử dụng cơ chất là xylobioza, do pic sắc ký chỉ quan sát được đối với xylobioza có thời gian lưu xấp xỉ bằng 12,3 phút ngay cả

đối với dịch thủy phân với thời phản ứng enzym bằng 90 phút (ký hiệu “sau phản ứng” trên sắc ký đồ) là giống như dịch thủy phân với thời gian phản ứng enzym bằng 0 phút (ký hiệu “trước phản ứng” trên sắc ký đồ), điều này chứng tỏ rằng xylobioza không bị phân giải bởi BGL theo sáng chế.

(7) Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ của hoạt tính phân giải PNPG

Mức độ phụ thuộc vào nhiệt độ của hoạt tính phân giải PNPG của BGL được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu enzym được điều chế theo phần (3) nêu trên.

Cụ thể, sau khi thực hiện các phản ứng enzym theo cùng cách thức như được mô tả trong phần *Đánh giá hoạt tính phân giải PNPG* trong mục (4) nêu trên chỉ khác là thực hiện các phản ứng này ở nhiệt độ 30°C, 45°C, 60°C, 75°C hoặc 90°C, 200µL dung dịch phản ứng được lấy ra từ mỗi ống, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 420nm (A420) và định lượng nồng độ PNP trong dung dịch phản ứng sau khi kết thúc phản ứng enzym từ đường chuẩn được dựng trước.

Các kết quả định lượng nồng độ PNP của mỗi dung dịch phản ứng và các trị số hoạt tính tương đối (%) tính theo trị số 100% là hoạt tính phân giải PNPG của dung dịch phản ứng có nồng độ PNP cao nhất được thể hiện trên Bảng 3. Nồng độ PNP trong dung dịch phản ứng sau khi kết thúc phản ứng phụ thuộc vào hoạt tính phân giải PNPG của BGL. Như được thể hiện trên bảng 3, BGL theo sáng chế đã được kiểm chứng là có hoạt tính phân giải PNPG ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 75°C, và có hoạt tính phân giải PNPG mạnh nhất ở nhiệt độ 60°C.

Bảng 3

Nhiệt độ phản ứng (°C)	30	45	60	75	90
Nồng độ PNP (µM)	59,43	168,57	252,14	43,71	0,29
Hoạt tính phản ứng (%)	23,6	66,9	100,0	17,3	0,1

(8) Mức độ phụ thuộc vào độ pH của hoạt tính phân giải PNPG

Mức độ phụ thuộc vào độ pH của hoạt tính phân giải PNPG của BGL được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu enzym được điều chế theo phần (3) nêu trên.

Cụ thể, sau khi thực hiện các phản ứng enzym theo cùng cách thức như được mô tả trong phần *Đánh giá hoạt tính phân giải PNPG* trong mục (4) nêu trên chỉ khác là sử dụng dung dịch đệm HCl-KCl 200mM (pH = 1,5), dung dịch đệm xitrat-phosphat (pH =

3,0), dung dịch đệm axit axetic 200mM (pH = 5,5) hoặc dung dịch đệm phosphat 200mM (pH = 8,0) để trộn với dung dịch PNPG, 200 μ L dung dịch phản ứng được lấy ra từ mỗi ống, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 420nm (A420) và định lượng nồng độ PNP trong dung dịch phản ứng sau khi kết thúc phản ứng enzym từ đường chuẩn được dựng trước.

Các kết quả định lượng nồng độ PNP của mỗi dung dịch phản ứng và các trị số hoạt tính tương đối (%) tính theo trị số 100% là hoạt tính phân giải PNPG của dung dịch phản ứng có nồng độ PNP cao nhất được thể hiện trên Bảng 4. Như được thể hiện trên bảng 4, mặc dù BGL theo sáng chế đã được kiểm chứng là có hoạt tính phân giải PNPG ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,5 và có hoạt tính phân giải PNPG mạnh nhất ở độ pH = 3,0, nhưng enzym này không có hoạt tính phân giải PNPG ở độ pH = 1,5 và hầu như không có hoạt tính phân giải PNPG ở độ pH = 8,0.

Bảng 4

Độ pH của dung dịch phản ứng	1,5	3,0	5,5	8,0
Nồng độ PNP (μ M)	0,00	236,14	59,43	7,14
Hoạt tính phản ứng (%)	0,0	100,0	25,2	3,0

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Enzym β -glucosidaza theo sáng chế, polynucleotit mã hóa enzym này, vector biểu hiện chứa polynucleotit này, và thể biến nạp chứa vector biểu hiện này có thể được áp dụng trong lĩnh vực sản xuất năng lượng từ nguyên liệu chứa xenluloza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HONDA MOTOR CO., LTD.
 <120> ENZYM β -GLUCOSIDAZA, VECTO BIỂU HIỆN ENZYM NÀY, THỂ BIẾN NẠP CHỨA VECTO NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM PHÂN GIẢI XENLULOZA BẰNG ENZYM NÀY
 <130> H112325703
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> *Acremonium cellulolyticus*
 <400> 1
 Met Val Arg Ser Thr Ile Leu Thr Thr Val Ala Leu Gly Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 Val Gln Gly Gln Tyr Ile Val Glu Gln Val Phe Pro Ser Pro Asn Ala
 20 25 30
 Thr Gly Ala Gly Asp Trp His Ala Ala Phe Leu Arg Ala Thr Thr Ala
 35 40 45
 Val Ala Glu Leu Asn Ile Thr Glu Lys Ala Phe Leu Val Thr Gly Val
 50 55 60
 Thr Gly Pro Cys Val Gly Asn Ile Ala Ala Ile Pro Arg Ile Gly Phe
 65 70 75 80
 Asn Gly Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Ala Ile Arg Gln Val Ser
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Val Phe Pro Ala Gly Val Ser Val Ala Ala Thr Trp Asp
 100 105 110
 Arg Asp Leu Leu Tyr Gln Arg Gly Val Gln Met Ala Ala Glu Phe Arg
 115 120 125
 Glu Lys Gly Ala His Val Ala Leu Gly Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly
 130 135 140
 Arg Ser Ala Leu Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro
 145 150 155 160
 Tyr Leu Thr Gly Ile Ser Phe Ala Glu Thr Ile Lys Gly Met Gln Ser
 165 170 175
 Gln Asn Val Gln Ala Cys Gly Lys His Tyr Ile Gly Tyr Glu Gln Glu
 180 185 190
 Thr Gln Arg Asn Pro Ser Thr Tyr Ser Asn Gly Thr Thr Glu Gln Glu
 195 200 205
 Ala Val Ser Ser Asn Ile Asp Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Leu
 210 215 220
 Trp Pro Phe Tyr Glu Gly Val Lys Ala Gly Met Ala Ser Val Met Cys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Asn Arg Ile Asn Glu Thr Tyr Ala Cys Gln Asn Ser Lys Thr
 245 250 255
 Leu Asn Gly Leu Leu Lys Glu Glu Leu Gly Phe Gln Gly Tyr Val Val
 260 265 270
 Ser Asp Trp Gly Gly Thr His Ser Gly Leu Asp Ser Ala Leu Ser Gly
 275 280 285
 Leu Asp Met Asp Met Pro Gly Ala Ile Ser Trp Gly Ser Asp Ser Ala
 290 295 300
 Thr Asn Ser Tyr Phe Gly Asn Asn Leu Thr Ala Met Ile Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Glu Ser Arg Leu Asp Asp Met Val Lys Arg Ile Leu Thr
 325 330 335
 Pro Tyr Tyr Tyr Leu Asn Gln Asp Ser Glu Asp Tyr Pro Thr Ile Asp
 340 345 350
 Leu Asp Thr Ala Gln Leu Ser Tyr Gly Leu Phe Gly Asp Asp Leu Pro
 355 360 365
 Ser Phe Leu Tyr Ser Phe Asn Met Gly Asn Leu Ser Asp Ile Asn Arg
 370 375 380
 Asp Val Arg Asp Asn His Arg Asp Leu Ile Arg Glu Ile Gly Gly Ala
 385 390 395 400
 Ser Ala Val Leu Leu Lys Asn Val Asp Asn Thr Leu Pro Leu Ser Lys
 405 410 415
 Ser Ile Lys Arg Ile Ser Val Phe Gly Asn Asp Ala Ala Asp Leu Ser
 420 425 430
 Gly Gly Pro Tyr Asp Pro Ser Asn Thr Asn Gly Val Leu Ala Val Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Ala Gly Arg Phe Thr Asn Leu Ile Ala Pro Leu Glu
 450 455 460
 Ala Ile Lys Tyr Arg Asn Pro Gln Ala Leu Val Gln Tyr Val Thr Asp
 465 470 475 480
 Asn Thr Leu Leu Thr Gln Asp Ala Ser Ser Thr Leu Asp Thr Val Tyr
 485 490 495
 Pro Thr Ala Asp Val Cys Leu Val Phe Leu Lys Ser Tyr Ala Thr Glu

500 505 510
 Gly Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ile Ala Asp Asp Asn Ser Thr Ala Leu
 515 520 525
 Val Glu Ala Val Thr Ser Tyr Gly Gly Cys Pro Ser Thr Val Val Ile
 530 535 540
 Leu His Ser Val Gly Ala Asn Leu Leu Pro Trp Ala Asp Asn Ala Asn
 545 550 555 560
 Ile Thr Gly Ile Ile Ala Ala His Leu Pro Gly Glu Gln Ala Gly Asn
 565 570 575
 Ser Ile Val Asp Val Leu Phe Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu
 580 585 590
 Pro Tyr Thr Ile Ala Tyr Asn Glu Ser Asp Tyr Asn Ala Pro Ile Val
 595 600 605
 Asn Phe Thr Asp Ile Asp Asn Ser Asp Ala Asn Ile Trp Gln Ser Asn
 610 615 620
 Phe Thr Glu Gly Leu Met Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Tyr Asn Asn
 625 630 635 640
 Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Phe
 645 650 655
 Ser Ile Ser Asn Leu Leu Ile Ser Thr Asn Val Ser Ser Gly Ala Val
 660 665 670
 Ser Ala Thr Pro Cys Ser Leu Asn Gly Thr Val Ala Pro Pro Gly Gly
 675 680 685
 Asn Pro Asp Leu Tyr Thr Val Leu Ala Ser Val Gln Val Thr Ile Gln
 690 695 700
 Asn Thr Gly Lys Val Ala Gly Arg Ala Val Pro Gln Val Tyr Leu Ser
 705 710 715 720
 Phe Pro Ser Phe Gln Thr Asn Val Ser Gly Asp Gly Leu Pro Thr Pro
 725 730 735
 Val Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Thr Asp Asp Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 Gln Arg Val Thr Leu Thr Phe Asn Leu Arg Arg Met Asp Val Ser Ser
 755 760 765
 Trp Asp Val Val Gln Gln Glu Trp Val Ile Pro Ser Gly Asp Phe Gly
 770 775 780
 Val Leu Ala Gly Trp Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Gly Ser Leu
 785 790 795 800
 Thr Leu Leu

<210> 2
 <211> 2412
 <212> ADN
 <213> *Acremonium cellulolyticus*
 <400> 2

atggttcggt caacgattct cacaactgtc gctcttgggg cacagttggt tcaaggccag 60
 tacattgttg agcaggtctt tccatctccc aacgcaaccg gggccggaga ctggcacgca 120
 gccttctctc gcgccaccac gcgcgtcgca gaactaaaca tcaactgaaaa ggccttctta 180
 gtaccgcggt taacggggccc atgcgtcgga aacatcgcgg caatcccgcg cattggcttc 240
 aatggactgt gtttacaaga tggaccttta gctatccgtc aagttagtta tgcgagtggt 300
 ttccccgag gtgtgtctgt ggcggcgact tgggatagag atttgcttta tcagcggggt 360
 gtgcagatgg cggttagtt tagggagaag ggtgcgcatg tcgcgcttgg gcccgctcgca 420
 ggaacctctg gacgctctgc cctcgcgagg agaaactggg agggtttctc acccgatcca 480
 tatcttacag gcatctcctt gcgcgagacc atcaaaggaa tgcaatctca aaacgtgcag 540
 gctgcgggaa aacactatat cggctacgag caagaaaccc aacgcaaccc ctcaacatac 600
 tcaaacggca caactgagca agaagcagtt tcctctaata tcgacgaccg cacactccac 660
 gaattgtatc tatggcatt ctacgaaggc gtaaaactgt gtatggcatc tgtcatgtgc 720
 agctacaacc gtatcaacga gacgtatgca tgtcaaaaca gcaagactct caacggcctg 780
 ctcaaagagg agctcgggtt tcagggttat gtcgtgtcag actggggttg gacgcactct 840
 ggtctcgact ccgcgctatc cgggttggtat atggatatgc ccggcgcaat cagctggggt 900
 tctgatagtg ccaccaactc gtattttggg aacaatctaa ccgcgatgat caacaatggc 960
 agtctctcag agtcgaggct tgatgatatg gtgaagcgca tcctgacgcc gtattattat 1020
 ctcaatcagg attcggagga ttatccgacc atcgatcttg atacggcgca gttgtcgtac 1080
 ggggtgtttg gggatgattt gccttctttc ttgtattctt tcaatatggg gaattctgtca 1140
 gatattaatc gtgacgttag agacaatcat cgcgacctca ttcgagagat aggcgggtgcc 1200
 agtgccgtcc ttctcaaaaa cgtagacaac actctccctt tatcgaaaag cataaaacgc 1260
 atctcggtct ttggaaacga tgcagccgac ctatccggcg gaccgtacga tccatcaaac 1320
 actaacggag tcctagctgt tggcgggtgga tcaggagcag gtcgcttcac gaattctcatc 1380
 gcacccttag aagcaatcaa ataccgaac cctcaagcct tgggtgcaata tgtcacggat 1440
 aataccctcc tcacacaaga tgcttcaagt acattggaca ccgtctaccc taccgtgat 1500
 gtatgtcttg tattcctcaa atcctacgca acagaaggct acgaccgcac cacattaatc 1560
 gcagacgaca actccaccgc tctcgtcgaa gccgtcacca gctacggcgg ctgtcccagc 1620
 acagtcgtca tctgcactc cgtcggcgca aacctcctac cctgggcgga caacgccaat 1680
 attaccggaa taatcgacgc gcatctcccc ggagaacaag ccggcaactc catcgtggac 1740
 gtgtgtgttg gogatgtcag tccatccggc aaattgccct acacaatcgc gtacaacgag 1800
 agtgattaca atgcgcccat cgtgaatttc acggacatcg acaacagcga cgcgaaatata 1860
 tggcagtcga actttaccga gggcttgatg atcgattacc gtcatttcga ttataataac 1920
 atcacgccgc ggtatgagtt tggatatgga ttgtcgtaca caaatttctc gatatcgaat 1980

```

ttattgattt cgacgaatgt tagcagtggc gcggtatcgg cgaccccggt ctctcttaat 2040
gggactgttg caccgccagg agggaaatcca gatctgtaca ccgtgcttgc cagtgtgcaa 2100
gtcacaaattc agaacacagg caaagtcgca ggtcgtgccc tgccgcagggt ttatctctcg 2160
ttcccttcat ttcagacaaa tgtttctggt gatggactgc cgactccggt aaaagtactt 2220
cgcggtgttg ataggaccga cgacctgaaa gcaggtcagc gggttacgct gacatttaat 2280
ctcaggcgta tggatgtttc gtcgtgggat gtggtgcagc aggaatgggt gattccatca 2340
ggagattttg gtgtgttggc cggttggagt agtcgtgatt tgcctttgag tgggagtgtt 2400
acgttgctgt aa 2412

<210> 3
<211> 2567
<212> ADN
<213> Acremonium cellulolyticus
<220>
<221> CDS
<222> đoạn gen nối (1..88,141..463,517..645,696..2567)
<223> /gen = "BGL", /sản phẩm gen = "BGL"
<220>
<221> exon
<222> <1..88
<223> /số lượng = 1, /gen = "BGL"
<220>
<221> intron
<222> 89..140
<223> /số lượng = 1, /gen = "BGL"
<220>
<221> exon
<222> 141..463
<223> /số lượng = 2, /gen = "BGL"
<220>
<221> intron
<222> 464..516
<223> /số lượng = 2, /gen = "BGL"
<220>
<221> exon
<222> 517..645
<223> /số lượng = 3, /gen = "BGL"
<220>
<221> intron
<222> 646..695
<223> /số lượng = 3, /gen = "BGL"
<220>
<221> exon
<222> 696..2567
<223> /số lượng = 4, /gen = "BGL"
<400> 3
atggttcggt caacgattct cacaactgtc gctcttgagg cacagttggt tcaaggccag 60
tacattgttg agcaggtctt tccatctcgt aagtacctcc tcacccttca aataatcacc 120
caccacaactg tcgattacag ccaacgcaac cggggccgga gactggcacg cagccttctc 180
ccgcgccacc accgcccgtc cagaactaaa catcactgaa aaggccttcc tagtcaccgg 240
cgtaacgggc ccatgcgtcg gaaacatcgc ggcaatcccg cgcatgtgct tcaatggact 300
gtgtttacaa gatggacctt tagctatccg tcaagttagt tatgcgagtg tgtttcccgc 360
aggtgtgtct gtggcggcga cttgggatag agatttgctt tatcagcggt gtgtgcagat 420
ggcggtctgag tttagggaga aggtgtgcga tgtcgcgctt gggtagcttc ttaaaccaat 480
atcaggatag gcatatgctg atattgtctg atcaggcccg tcgcaggacc tctcggacgc 540
tctgcccctc gcggcagaaa ctgggagggt ttctcaccgg atccatatct tacaggcatc 600
tcttcgcccg agaccatcaa agaatgcaa tctcaaaacg tgcagggtaa gccttactac 660
caccctttca aagcgagata ctgatgagag gactagcctg cggaaaacac tatatcggt 720
acgagcaaga aaccaacgc aaccctcaa cataactcaa cggcacaact gagcaagaag 780
cagtttcttc taatatcgac gaccgcacac tccacgaatt gtatctatgg ccattctacg 840
aaggcgtaaa agctggtatg gcatctgtca tgtgcagcta caaccgtatc aacgagacgt 900
atgcatgtca aaacagcaag actctcaacg gctgtctcaa agaggagctc gggtttcagg 960
gctatgtcgt gtcagactgg ggtgggacgc actctggtct cgactccgcg ctatccgggt 1020
tggatatgga tatgcccggc gcaatcagct ggggttctga tagtgccacc aactcgtatt 1080
ttgggaacaa tctaaccgcy atgatcaaca atggcagtct ctacagatcg aggcttgatg 1140
atatggtgaa gcgcactctg acgcccgtatt attatctcaa tcaggattcg gaggattatc 1200
cgaccatcga tcttgatacg gcgcagttgt cgtacgggtt gtttggggat gatttgctt 1260
ctttcttgta ttctttcaat atggggaatc tgtcagatat taatcgtgac gttagagaca 1320
atcatcgca tctcatctga gagatagcgc gtgccagtgc cgtccttctc aaaaacgtag 1380
acaacactct ccccttatcg aaaagcataa aacgcattct ggtctttgga aacgatgcag 1440
ccgacctatc cggcggaacc tacgatccat caaacactaa cggagtccta gctgttggcg 1500
gtggatcagg agcaggtcgc ttcacgaatc tcatcgaccc cctagaagca atcaaatacc 1560
gaaacctctc agccttggtg caatatgtca cggataatac cctcctcaca caagatgctt 1620
caagtacatt ggacaccgtc taccctaccg ctgatgtatg tcttgatttc ctcaaatcct 1680
acgcaacaga aggtacgac gcgaccacat taatcgaga cgacaactcc accgctctcg 1740
tcgaagccgt caccagctac ggcggctgtc ccagcacagt cgtcatcctg cactccgtcg 1800
gcgcaaacct cctaccctgg gcggacaacg ccaatatctc cgaataatc gcagcgcac 1860
tccccggaga acaagccggc aactccatcg tggacgtgtt gtttggcgat gtcagtccat 1920

```

ccggcaaatt gccctacaca atcgcgtaca acgagagtga ttacaatgcg cccatcgtga 1980
 atttcacgga catcgacaac agcgacgcga atatatggca gtcgaacttt accgagggct 2040
 tgatgatcga ttaccgtcat ttccgattata ataacatcac gccgcggtat gagtttggat 2100
 atggattgtc gtacacaaaat ttctcgatat cgaatttatt gatttcgacg aatgttagca 2160
 gtggcgcggt atcggcgacc ccgtgctctc ttaatgggac tgttgcaccg ccaggagggg 2220
 atccagatct gtacaccgtg ctgcccagtg tgcaagtcac aattcagaac acaggcaaag 2280
 tcgcaggctg tgccgtgccg caggtttatc tctcgttccc ttcatttcag acaaatgttt 2340
 ctggtgatgg actgccgact ccggtaaaaa tacttcgcgg gtttgatagg accgacgacc 2400
 tgaaagcagg tcagcgggtt acgctgacat ttaatctcag gcgtatggat gtttcgtcgt 2460
 gggatgtggt gcagcaggaa tgggtgattc catcaggaga ttttggtgtg ttggccgggt 2520
 ggagtagtcg tgatttgcct ttgagtggga gtttgacgtt gctgtaa 2567

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 4
 tcctccaagt tacccatggt tcggtcaacg

30

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 5
 cgcttcgtcg accccttaca gcaacgtcaa

30

<210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 6
 atgctcggga gctttggatt tcctacgtct tc

32

<210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 7
 atgcatatgt cgagagtgtt gtgtgggtca acg

33

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 8
 atggtcgacg aagcgtaca gtaggccta gac

33

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 9
 atgcccgaga gtaaccatt cccggttctc tag

33

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 10
 atggctagca gatctcgcg cagggttgac

30

<210> 11
 <211> 40
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi
 <400> 11
 atggtcgacc ccgggtaact tggaggacgg aagaaaagag

40

<210> 12
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> *Acremonium cellulolyticus*
 <220>
 <223> Xenlobiohydrolazal
 <400> 12
 Met Ser Ala Leu Asn Ser Phe Asn Met Tyr Lys Ser Ala Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gln Ile Gly Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ala Glu Thr His Pro Ser Leu Ser Trp Ser Thr Cys Lys Ser Gly Gly
 35 40 45
 Ser Cys Thr Thr Asn Ser Gly Ala Ile Thr Leu Asp Ala Asn Trp Arg
 50 55 60
 Trp Val His Gly Val Asn Thr Ser Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr
 65 70 75 80
 Trp Asn Ser Ala Ile Cys Asp Thr Asp Ala Ser Cys Ala Gln Asp Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Ser
 100 105 110
 Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Gly Ser Asn Val Gly Ser
 115 120 125
 Arg Thr Tyr Leu Met Ala Asp Asn Thr His Tyr Gln Ile Phe Asp Leu
 130 135 140
 Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Thr Val Asp Val Ser His Leu Pro Cys
 145 150 155 160
 Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Thr Met Asp Ala Asp Gly Gly
 165 170 175
 Val Ser Lys Tyr Pro Asn Asn Lys Ala Gly Ala Gln Tyr Gly Val Gly
 180 185 190
 Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Ala Gly Gln
 195 200 205
 Ala Asn Val Glu Gly Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly
 210 215 220
 Ile Gly Asn His Gly Ala Cys Cys Ala Glu Leu Asp Ile Trp Glu Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Ile Ser Glu Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly
 245 250 255
 Leu Ser Val Cys Thr Thr Asp Ala Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Asp
 260 265 270
 Arg Tyr Ala Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr
 275 280 285
 Arg Leu Gly Val Thr Asp Phe Tyr Gly Ser Gly Lys Thr Val Asp Thr
 290 295 300
 Thr Lys Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Val Thr Asn Asp Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Thr Gly Ser Leu Ser Glu Ile Arg Arg Tyr Tyr Val Gln Asn Gly
 325 330 335
 Val Val Ile Pro Gln Pro Ser Ser Lys Ile Ser Gly Ile Ser Gly Asn
 340 345 350
 Val Ile Asn Ser Asp Tyr Cys Ala Ala Glu Ile Ser Thr Phe Gly Gly
 355 360 365
 Thr Ala Ser Phe Ser Lys His Gly Gly Leu Thr Asn Met Ala Ala Gly
 370 375 380
 Met Glu Ala Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp Tyr Ala
 385 390 395 400
 Val Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Ala Thr Gly
 405 410 415
 Thr Pro Gly Ala Ala Arg Gly Thr Cys Ala Thr Thr Ser Gly Asp Pro
 420 425 430
 Lys Thr Val Glu Ala Gln Ser Gly Ser Ser Tyr Val Thr Phe Ser Asp
 435 440 445
 Ile Arg Val Gly Pro Phe Asn Ser Thr Phe Ser Gly Gly Ser Ser Thr
 450 455 460
 Gly Gly Ser Thr Thr Thr Thr Ala Ser Arg Thr Thr Thr Ser Ala
 465 470 475 480
 Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Ser Thr Gly Thr Gly Val Ala Gly
 485 490 495
 His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys
 500 505 510
 Val Ser Gly Thr Thr Cys Thr Val Val Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys

515 520 525
 Leu

 <210> 13
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> *Acremonium cellulolyticus*
 <220>
 <223> Endoglucanaza
 <400> 13
 Met Lys Leu Thr Phe Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala Ser Ala Gln
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Gln Tyr Ser
 20 25 30
 Val Asn Asn Asn Leu Trp Gly Glu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Cys
 35 40 45
 Thr Tyr Val Asn Ser Ile Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Ser Thr Thr
 50 55 60
 Trp Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ser
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Gly Leu Thr Lys Lys Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser Ile
 85 90 95
 Pro Thr Ser Val Gln Trp Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Ile Val Ala Asp
 100 105 110
 Val Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asp Ile Asn His Val Thr Tyr
 115 120 125
 Ser Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Gly Ala
 130 135 140
 Gln Pro Leu Gly Ser Gln Ile Gly Thr Ala Asn Val Gly Gly Ala Thr
 145 150 155 160
 Trp Gln Leu Trp Tyr Gly Val Asn Gly Ser Gln Lys Thr Tyr Ser Phe
 165 170 175
 Val Ala Ser Ser Gln Thr Thr Ser Trp Asn Gly Asp Ile Leu Gln Phe
 180 185 190
 Phe Lys Tyr Leu Gln Ser Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser Ser Gln Tyr
 195 200 205
 Leu Ile Asp Leu Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gln Thr
 210 215 220
 Thr Leu
 225

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Enzym β -glucosidaza chứa miền xúc tác của β -glucosidaza bao gồm:

(A) polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1,

(B) polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza, hoặc

(C) polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

2. Enzym β -glucosidaza theo điểm 1, trong đó enzym này có hoạt tính β -glucosidaza ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C và sử dụng cơ chất là p-nitrophenyl β -D-glucopyranosit.

3. Polynucleotit chứa vùng mã hóa miền xúc tác của enzym β -glucosidaza bao gồm:

(a) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1,

(b) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin thu được bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có hoạt tính β -glucosidaza, hoặc

(c) trình tự bazơ mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 bằng 92% hoặc cao hơn, và có hoạt tính β -glucosidaza.

4. Vector biểu hiện, trong đó vector này chứa polynucleotit theo điểm 3, và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza ở tế bào vật chủ.

5. Thể biến nạp, trong đó thể biến nạp này chứa vector biểu hiện theo điểm 4.

6. Th thể biến nạp theo điểm 5, trong đó thể biến nạp này là sinh vật nhân thật.

7. Th thể biến nạp theo điểm 5, trong đó thể biến nạp này là nấm sợi.

8. Phương pháp sản xuất enzym β -glucosidaza bao gồm bước tạo ra polypeptit có hoạt tính β -glucosidaza trong thể biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7.

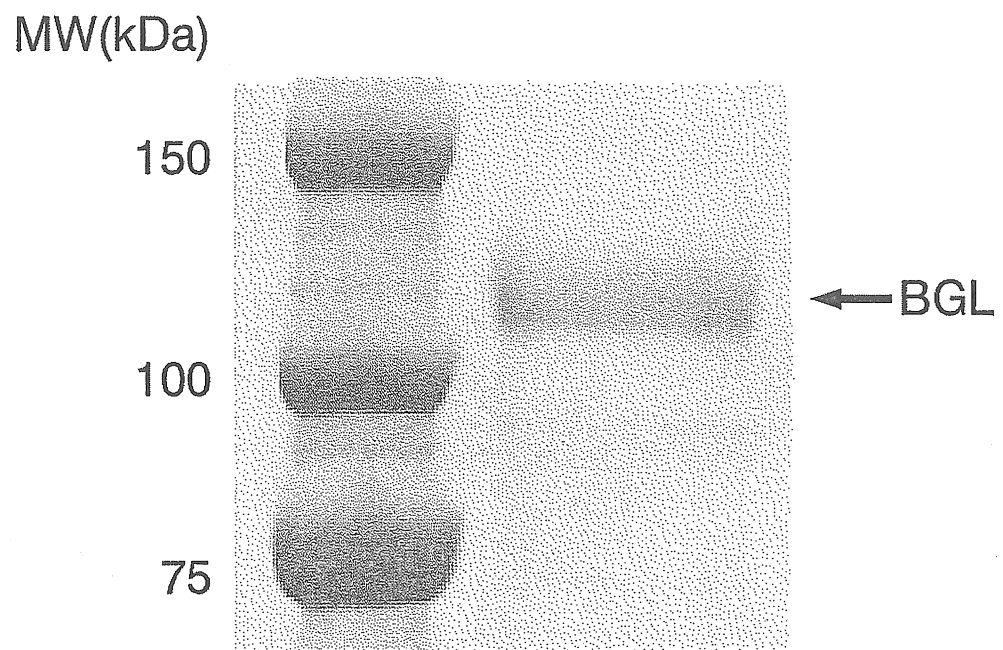
9. Hỗn hợp xenlulaza chứa enzym β -glucosidaza theo điểm 1 hoặc 2 hoặc enzym β -glucosidaza thu được bằng phương pháp theo điểm 8, và ít nhất một loại xenlulaza khác.

10. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải xenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với enzym β -glucosidaza theo điểm 1 hoặc 2 hoặc enzym β -glucosidaza thu được bằng phương pháp theo điểm 8.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với ít nhất một loại xenlulaza khác.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12, endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13, và ít nhất một loại hemixenlulaza.

**Fig.1**

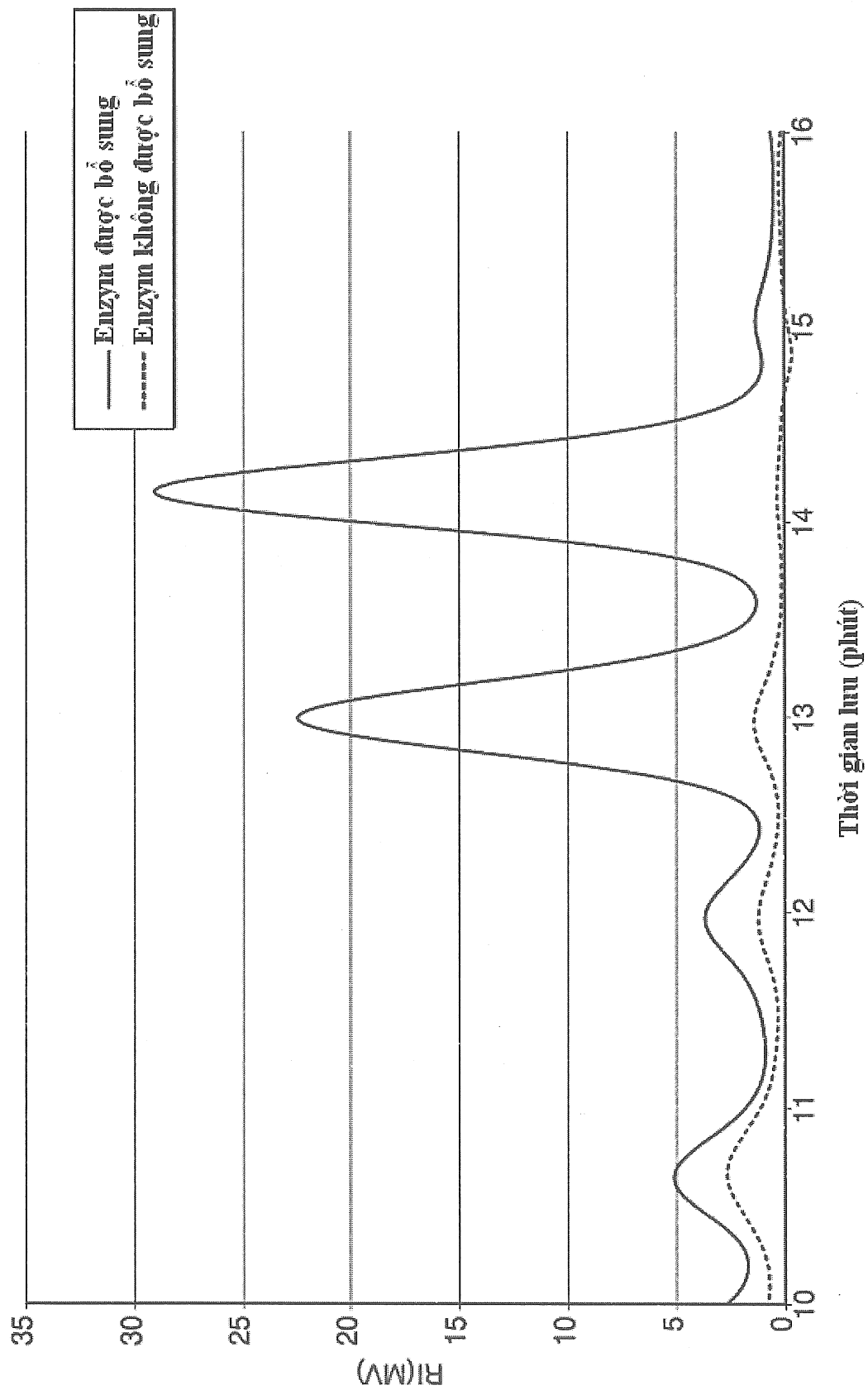


Fig.2

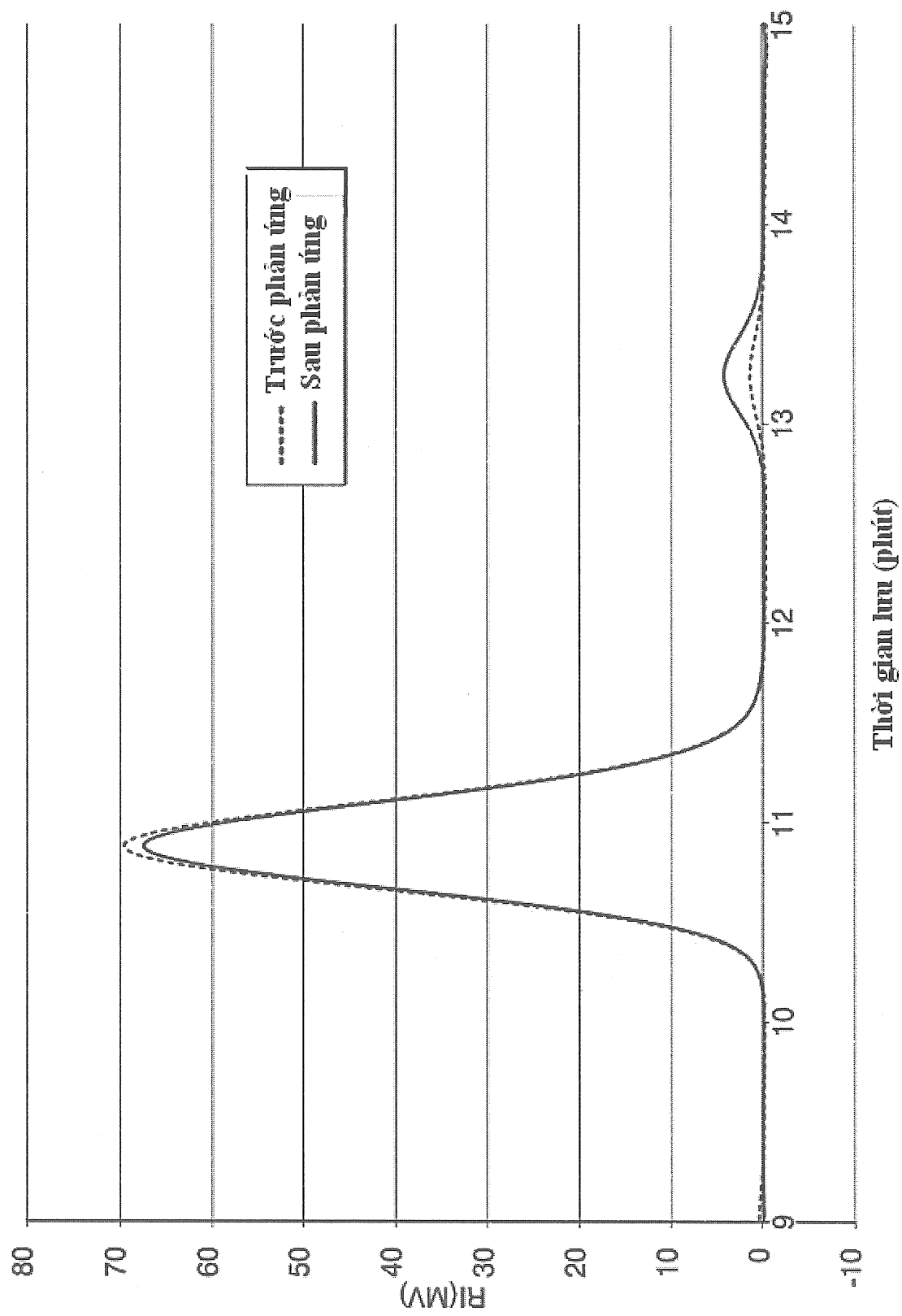


Fig.3

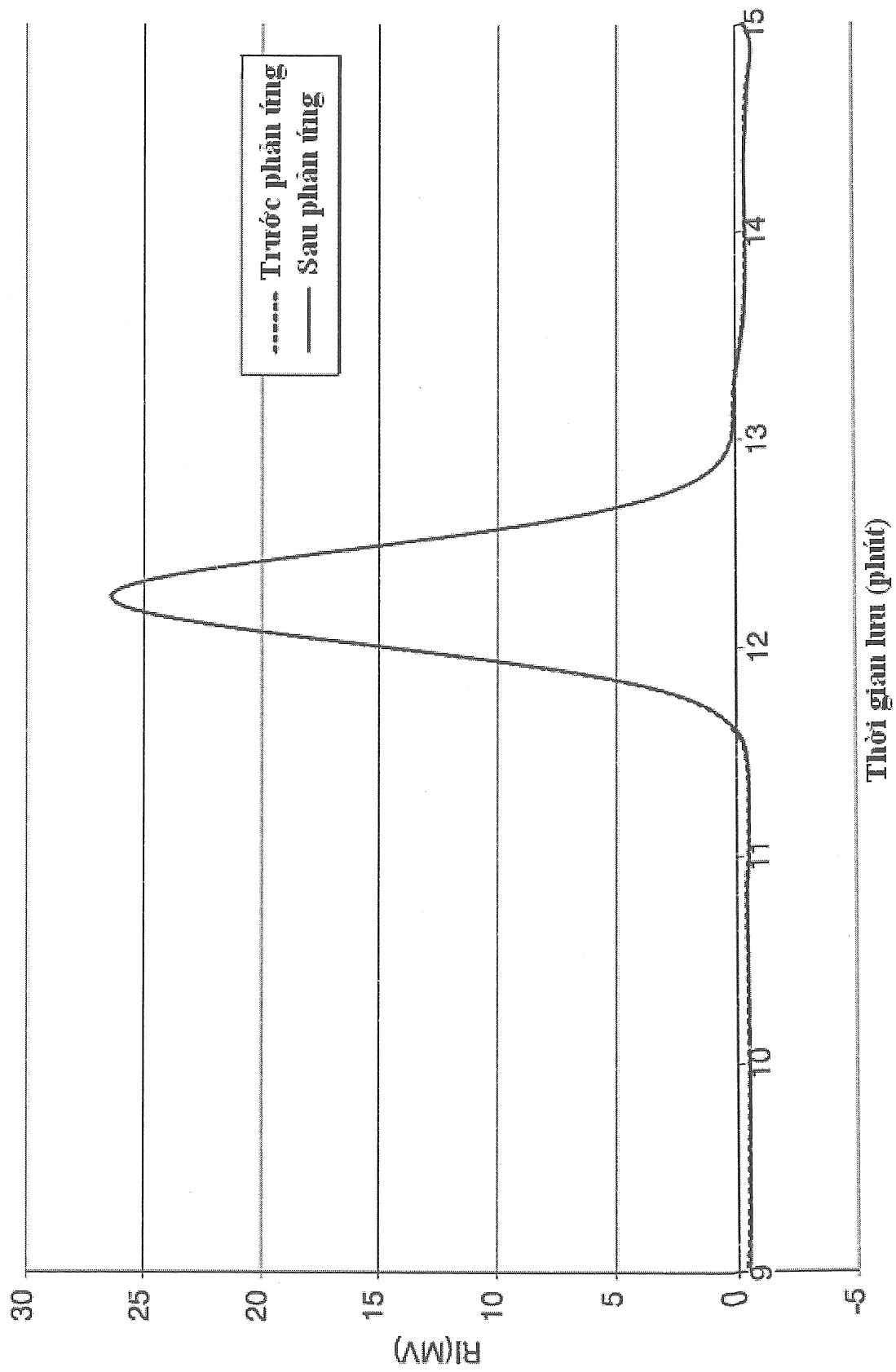


Fig.4