



(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)



1-0023563

(51)<sup>7</sup> C12N 9/42; C13K 1/02

(13) B

(21) 1-2014-01787

(22) 27/12/2012

(86) PCT/JP2012/083943 27/12/2012

(87) WO2013/103127 11/07/2013

(30) 2012-001670 06/01/2012 JP

(45) 27/04/2020 385

(43) 27/10/2014 319A

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

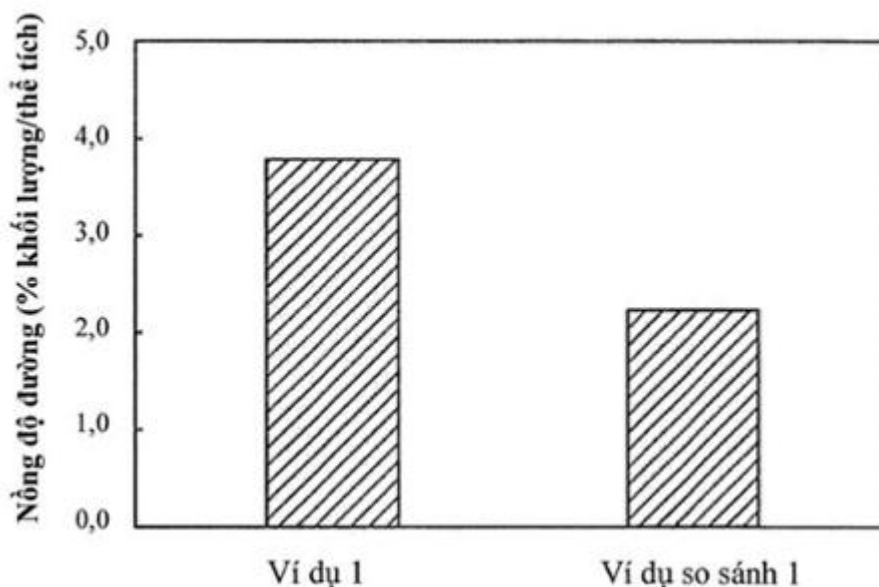
1-1, Minami-Aoyama 2-chome, Minato-ku, Tokyo 107-8556, Japan

(72) Maiko FUKUURA (JP); Shigenobu MITSUZAWA (JP); Migiwa TAKEDA (JP);  
Takeshi ARA (JP); Daisuke SHIBATA (JP)

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

#### (54) CHẾ PHẨM ENZYM ĐƯỜNG HÓA

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm enzym đường hóa, mà hiệu suất đường hóa tốt có thể đạt được ngay cả với lượng sử dụng ít. Chế phẩm enzym đường hóa đưa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất vào xử lý đường hóa. Chế phẩm enzym đường hóa bao gồm endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza, xenlobiohydrolaza chứa vùng gắn kết xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn kết xenluloza.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm enzym đường hóa để đưa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza vào xử lý đường hóa.

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

Nhiên liệu xăng pha etanol được nghiên cứu gần đây để sử dụng làm nhiên liệu cho xe ô tô. Bằng cách sử dụng etanol sinh học được tạo ra bằng cách lên men và chưng cất cơ chất thực vật như là etanol, người ta tin rằng, nếu việc quản lý đất được thực hiện chặt chẽ, thì cái gọi là tác động trung hòa cacbon có thể đạt được để giảm lượng cacbon dioxit phát thải và góp phần ngăn chặn sự nóng lên toàn cầu.

Tuy nhiên, vấn đề là nếu các sản phẩm nông nghiệp, như mía và ngô, được sử dụng ở dạng cơ chất thực vật, lượng lớn các sản phẩm nông nghiệp này được tiêu thụ như là nguồn nguyên liệu cho etanol, và việc cung cấp thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bị giảm đi. Do đó, công nghệ sản xuất etanol sử dụng sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza không thích hợp làm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi như là cơ chất thực vật đã được nghiên cứu.

Do sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza chứa xenluloza, etanol có thể thu được bằng cách phân giải xenluloza thành glucoza bằng cách xử lý đường hóa sử dụng enzym đường hóa và lên men glucoza thu được. Bởi vậy, enzym đường hóa, ví dụ, xenlulaza có nguồn gốc từ *Acremonium cellulolyticus* đã được biết đến trước đây (xem, ví dụ, tài liệu Patent 1).

Do enzym đường hóa đắt tiền, nên nồng độ sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza làm cơ chất được đặt ở mức thấp trong suốt quá trình tạo etanol để giảm lượng sử dụng enzym đường hóa. Tuy nhiên, nếu nồng độ cơ chất được đặt ở mức thấp, thì nồng độ dung dịch đường hóa thu được cũng thấp, và do đó nồng độ etanol tạo thành bằng cách lên men dung dịch đường hóa cũng trở thành thấp. Kết quả là, xảy ra vấn đề là thời gian và nguồn nhiệt cần để chưng cất giảm, khi etanol thu được được chưng cất đến cô đặc.

Để giải quyết vấn đề này, có thể hiểu rằng tăng nồng độ cơ chất cũng như việc dùng enzym đường hóa đến mức cao, để đạt được nồng độ etanol cao, và làm giảm năng lượng cần để cô đặc, chưng cất etanol và phương pháp tương tự, hiệu suất năng lượng tổng cộng

được cải thiện. Tuy nhiên, trong trường hợp này, vì enzym đường hóa đắt tiền, nên vấn đề là chi phí tăng lên do tăng lượng sử dụng.

Do đó, để giải quyết vấn đề này, mong muốn là hiệu suất đường hóa được duy trì và đồng thời lượng dùng enzym đường hóa được giảm đi.

Tài liệu tham khảo:

Tài liệu Patent 1: Đơn đăng ký sáng chế Nhật, công bố đơn số 2010-148427

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

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Tuy nhiên, nếu lượng tổng enzym đường hóa đơn thuần được giảm đi, xảy ra sự bất tiện là hiệu suất đường hóa cũng giảm đi theo tỷ lệ với lượng enzym đường hóa.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm enzym đường hóa mà có thể loại bỏ sự bất tiện này và đạt được hiệu suất đường hóa tốt hơn với lượng sử dụng thấp.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa sử dụng chế phẩm enzym đường hóa.

Giải quyết vấn đề

Theo các nghiên cứu của tác giả sáng chế này, người ta biết rằng xenlulaza được tách chiết từ *Acremonium cellulolyticus* là hỗn hợp của nhiều xenlulaza bao gồm những loại không hiệu quả lắm trong việc đường hóa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza.

Do đó, người ta hiểu rằng, bằng cách đơn giản làm giảm tổng lượng hỗn hợp xenlulaza, các xenlulaza với hiệu quả tốt hơn trong việc đường hóa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza cũng như các xenlulaza không có các hiệu quả này được giảm đi ngang nhau, và hiệu suất đường hóa được giảm tỷ lệ với lượng enzym đường hóa.

Các tác giả sáng chế này nghiên cứu nhiều khía cạnh khác nhau về hiệu suất đường hóa của các xenlulaza riêng biệt mà được chứa trong hỗn hợp xenlulaza so với sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza. Kết quả là, đã tìm thấy chế phẩm enzym đường hóa bao gồm sự kết hợp cụ thể của các xenlulaza có thể thể hiện hiệu suất cao hơn trong việc đường hóa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza, do đó, hoàn thành sáng chế này.

Nghĩa là, theo sáng chế, chế phẩm enzym đường hóa để đưa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất vào xử lý đường hóa được đặc trưng ở chỗ chế phẩm

enzym đường hóa bao gồm endoglucanaza không chứa vùng gắn xenluloza, xenlobiohydrolaza chứa vùng gắn kết xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn xenluloza.

Ở đây, endoglucanaza là enzym đường hóa để thủy phân xenluloza từ vùng bên trong của nó thành chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn. Hơn nữa, xenlobiohydrolaza là enzym đường hóa để thủy phân xenluloza hoặc chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn từ đầu của nó thành xenlobioza. Hơn nữa,  $\beta$ -glucosidaza là enzym đường hóa để thủy phân xenlobioza thành glucoza. Trong khi đó, vùng gắn xenluloza nghĩa là cấu trúc gắn kết enzym đường hóa lên bề mặt xenluloza.

Với chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế, đầu tiên, endoglucanaza tác động đến sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza. Do endoglucanaza không chứa miền gắn kết xenluloza, nên nó không gắn kết với vị trí đặc hiệu trên bề mặt xenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất, và có thể tiếp xúc các vị trí không đặc hiệu trong phạm vi rộng của chuỗi phân tử của xenluloza và thu được chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn.

Mặt khác, nếu endoglucanaza chứa miền gắn kết xenluloza, endoglucanaza sẽ ở lại vùng phản ứng thủy phân, ngay cả khi nó đã thủy phân xenluloza thành chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn. Kết quả là, cơ hội tiếp xúc giữa endoglucanaza và xenluloza khác bị giảm đi và hiệu quả tạo ra chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn cũng bị giảm.

Do xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết xenluloza, nó thường gắn kết với xenluloza và thủy phân xenluloza từ đầu của nó để thu được xenlobioza, nhưng nếu có mặt chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn, thì nó cũng gắn với chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn và thủy phân chúng từ đầu của nó để tạo thành xenlobioza. Do đó, nếu chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn được tạo ra bằng endoglucanaza, thì số điểm khởi đầu phản ứng cho xenlobiohydrolaza tăng và sự tạo ra xenlobioza bằng xenlobiohydrolaza được xúc tiến.

Hơn nữa, do  $\beta$ -glucosidaza cũng chứa miền gắn kết xenluloza,  $\beta$ -glucosidaza cũng có mặt trong vùng phản ứng nơi mà xenlobiohydrolaza tạo thành xenlobioza. Do đó, xenlobioza thu được bằng xenlobiohydrolaza có thể bị thủy phân ngay lập tức bằng  $\beta$ -glucosidaza thành glucoza.

Do đó, với chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza hợp tác để đường hóa xenluloza chứa trong sinh khối

trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất, để hiệu suất đường hóa có thể được cải thiện và có thể thu được hiệu suất đường hóa tốt hơn với lượng sử dụng ít.

Miền gắn kết xenluloza chứa trong  $\beta$ -glucosidaza của chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế tốt hơn là chứa trình tự axit amin có độ tương đồng không nhỏ hơn 70% so với trình tự axit amin của miền gắn kết xenluloza chứa trong xenlobiohydrolaza.

Độ tương đồng của trình tự axit amin của miền gắn kết xenluloza càng cao thì khả năng gắn kết vào cùng vị trí càng cao, khi các miền gắn kết vào bề mặt xenluloza hoặc chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn. Do đó, nếu xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza chứa các miền gắn kết xenluloza với trình tự axit amin có độ tương đồng không nhỏ hơn 70% được sử dụng, và khi xenlobiohydrolaza tạo ra xenlobioza, khả năng tồn tại  $\beta$ -glucosidaza trong cùng vùng phản ứng tăng lên.

Do đó, với chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza có thể hợp tác để thực hiện sự đường hóa đạt hiệu quả hơn.

Trong khi nếu sự tương đồng là nhỏ hơn 70%, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza có thể không có mặt đáng kể trong cùng vùng phản ứng.

Trong chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế, nồng độ tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 80% theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm enzym đường hóa.

Nếu nồng độ tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza là 80% theo khối lượng hoặc cao hơn so với tổng khối lượng chế phẩm enzym đường hóa, thì hiệu quả đường hóa giảm, và do đó, tốt hơn là nên chứa hemixenluloza chẳng hạn như xylanaza. Nếu nồng độ tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza nhỏ hơn 30% khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm enzym đường hóa, thì có thể không đạt được đủ hiệu suất đường hóa.

Ví dụ về endoglucanaza trong chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1. Ví dụ về xenlobiohydrolaza trong chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2. Ví dụ về  $\beta$ -glucosidaza trong chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3.

Chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế tốt hơn là bao gồm endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza ở tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng 0,2 đến 2,5 : 1 : 0,2 đến 2,5.

Nếu tỷ lệ khối lượng của endoglucanaza so với khối lượng của xenlobiohydrolaza là nhỏ hơn 0,2, thì tốc độ tạo ra chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn được tạo ra từ xenluloza bằng endoglucanaza là quá chậm so với tốc độ tạo ra xenlobioza được tạo ra từ chuỗi ngắn  $\beta$ -1,4-glucan bằng xenlobiohydrolaza, và có thể không đạt được đủ hiệu quả đường hóa.

Mặt khác, nếu tỷ lệ khối lượng của endoglucanaza so với xenlobiohydrolaza vượt quá 2,5, thì tốc độ tạo ra chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn được tạo ra từ xenluloza bằng endoglucanaza là quá cao so với tốc độ tạo ra xenlobioza được tạo ra từ chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn bằng xenlobiohydrolaza, và có thể không đạt được đủ hiệu quả đường hóa.

Trong khi đó, nếu tỷ lệ khối lượng của  $\beta$ -glucosidaza so với xenlobiohydrolaza là nhỏ hơn 0,2, tốc độ tạo ra glucoza được tạo ra từ xenlobioza bằng  $\beta$ -glucosidaza là quá thấp so với tốc độ tạo ra xenlobioza được tạo ra từ chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn bằng xenlobiohydrolaza, và có thể không đạt được đủ hiệu quả đường hóa.

Mặt khác, nếu tỷ lệ khối lượng của  $\beta$ -glucosidaza so với xenlobiohydrolaza vượt quá 2,5, tốc độ tạo ra glucoza được tạo ra từ xenlobioza bằng  $\beta$ -glucosidaza là quá cao so với tốc độ tạo ra xenlobioza từ chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn bằng xenlobiohydrolaza, và có thể không đạt được đủ hiệu quả đường hóa.

Chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể còn chứa xylanaza hoặc xylosidaza. Nhờ chứa xylanaza hoặc xylosidaza, chế phẩm enzym đường hóa có thể đường hóa hemixenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất và thu được xyloza. Do đó, chế phẩm này có thể làm tăng tốc độ đường hóa của sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất.

Phương pháp tạo ra dung dịch đường hóa theo sáng chế là phương pháp tạo ra dung dịch đường hóa bao gồm việc thêm enzym đường hóa vào sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất để tạo ra hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa, và sau đó đưa hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa vào xử lý đường hóa để sản xuất dung dịch đường hóa, trong đó phương pháp này đặc trưng ở chỗ, dưới dạng enzym đường hóa, ít nhất một endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza, xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết

xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn kết xenluloza được thêm vào đồng thời với cơ chất.

Nếu enzym được thêm vào đồng thời như trên, đầu tiên endoglucanaza tác động đến xenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza. Do endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza, khi thêm vào cơ chất, nó không gắn kết với vị trí đặc hiệu của bề mặt xenluloza và có thể tiếp xúc các vị trí không đặc hiệu trong phạm vi rộng của chuỗi phân tử của xenluloza để thu được chuỗi ngắn  $\beta$ -1,4-glucan.

Vì xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết xenluloza, nó thường gắn với xenluloza và thủy phân xenluloza từ đầu của nó để thu được xenlobioza, nhưng nếu có mặt chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn, nó cũng gắn kết với chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn và thủy phân chuỗi ngắn này từ đầu của nó để thu được xenlobioza. Do đó, nếu chuỗi ngắn  $\beta$ -1,4-glucan được tạo ra bằng endoglucanaza, thì số điểm khởi đầu phản ứng xenlobiohydrolaza tăng lên và việc tạo ra xenlobioza bằng xenlobiohydrolaza được thúc đẩy.

Hơn nữa, do  $\beta$ -glucosidaza cũng chứa vùng gắn kết xenluloza,  $\beta$ -glucosidaza cũng có mặt trong vùng phản ứng, trong đó xenlobiohydrolaza sản xuất xenlobioza. Do đó, xenlobioza được sản xuất bằng xenlobiohydrolaza được thủy phân ngay lập tức bằng  $\beta$ -glucosidaza thành glucoza.

Do đó, theo phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa theo sáng chế, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza hợp tác để đường hóa xenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza, có thể sản xuất hiệu quả dung dịch đường hóa có nồng độ đường cao.

Phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa theo sáng chế là phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa bao gồm việc thêm enzym đường hóa vào sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất tạo ra hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa, và sau đó đưa hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa vào xử lý đường hóa để sản xuất dung dịch đường hóa, trong đó phương pháp này đặc trưng ở chỗ, dưới dạng enzym đường hóa, ít nhất một endoglucanaza không chứa miền gắn kết xenluloza được thêm vào cơ chất, và sau đó ít nhất xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa miền gắn kết xenluloza được thêm vào.

Nếu endoglucanaza được thêm vào trước đó như nêu trên, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza không có mặt trong vùng phản ứng của endoglucanaza. Do đó, endoglucanaza

được thêm trước đó có thể tiếp xúc chuỗi phân tử xenluloza hiệu quả hơn để ưu tiên thủy phân xenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza tạo ra chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn.

Kết quả là, khi xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza được thêm vào, so với trường hợp thêm đồng thời endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza, thì lượng chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn tăng lên. Do đó, xenlobiohydrolaza có thể dễ dàng thủy phân chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn thành xenlobioza.

Do  $\beta$ -glucosidaza có mặt trong vùng phản ứng thủy phân bằng xenlobiohydrolaza do chức năng của miền gắn kết xenluloza, nó có thể thủy phân hiệu quả xenlobioza để tạo ra glucoza.

Do đó, theo phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa theo sáng chế, bằng cách thêm trước endoglucanaza và sau đó thêm xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza vào, có thể thu được hiệu quả hơn dung dịch đường hóa có nồng độ đường cao.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ khối thể hiện phương án của phương pháp tạo ra dung dịch đường hóa theo sáng chế.

Fig. 2A và Fig. 2B là đồ thị thể hiện đường kính của khuẩn lạc của một chủng, mà từ chủng này chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể được tách chiết và đường kính của vòng phản ứng AZCL.

Fig. 3 là đồ thị thể hiện hoạt tính phân giải CMC của một chủng, mà từ chủng này chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế có thể được tách chiết.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện hiệu suất đường hóa của enzym đường hóa theo sáng chế.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ so với tổng khối lượng chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế trong quá trình tạo ra glucoza.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của tỷ lệ khối lượng endoglucanaza, xenlobiohydrolaza,  $\beta$ -glucosidaza, xylanaza, và  $\beta$ -xylosidaza trong chế phẩm enzym đường hóa theo sáng chế trong quá trình sản xuất saccarit.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả dưới đây một cách chi tiết viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo.

Fig. 1 thể hiện quy trình xử lý đường hóa trong việc tạo ra etanol sử dụng sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất.

Trong phương pháp xử lý đường hóa, đầu tiên nước amoniac được trộn lẫn với rom đã nghiền sơ qua dưới dạng một trong số sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất để điều chế hỗn hợp cơ chất chứa rom và amoniac. Trong trường hợp này, nồng độ nước amoniac nằm trong khoảng từ 20 đến 30% khối lượng/thể tích và hỗn hợp cơ chất tốt hơn là được điều chỉnh để chứa rom nằm trong khoảng từ 20 đến 70% khối lượng so với nước amoniac.

Sau đó, hỗn hợp cơ chất điều chế được duy trì ở nhiệt độ trong khoảng từ 25 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 2 đến 200 giờ để tiến hành tiền xử lý đường hóa. Kết quả là, sản phẩm tiền xử lý đường hóa chứa ammoniac được sản xuất, trong đó lignin được phân tách từ rom dưới dạng cơ chất hoặc rom bị trương nở.

Về vấn đề này, thuật ngữ "phân tách" nghĩa là, trong phương án này, ít nhất một phần liên kết ở các vị trí gắn của lignin gắn kết với xenluloza, v.v. bị phá vỡ. Thuật ngữ "trương nở" nghĩa là, do sự ngấm chất lỏng, các lỗ hổng được tạo ra trong xenluloza, v.v. tạo thành xenluloza tinh thể, hoặc các lỗ hổng được hình thành bên trong sợi xenluloza để giãn ra.

Tiếp theo, amoniac được tách bằng cách cho bay hơi amoniac từ sản phẩm tiền xử lý đường hóa chứa amoniac để thu được sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac. Sau đó, độ pH của sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac được điều chỉnh đến khoảng mà ở đó các enzym đường hóa có thể hoạt động, ví dụ nằm trong khoảng độ pH từ 3 đến 7.

Sau đó, các enzym đường hóa được thêm vào sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac đã được điều chỉnh độ pH để điều chế hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa, và sau đó thực hiện phương pháp xử lý đường hóa bằng cách duy trì hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 60°C trong 50 đến 150 giờ. Bằng cách xử lý đường hóa, xenluloza chứa trong hỗn hợp cơ chất/enzym đường hóa được thủy phân bằng

hoạt động của enzym đường hóa. Kết quả là, dung dịch đường hóa chứa saccarit như glucoza có thể thu được.

Trong phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa theo phương án của sáng chế, chế phẩm enzym đường hóa chứa endoglucanaza không chứa miền gắn kết xenluloza, xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa miền gắn kết xenluloza được dùng dưới dạng enzym đường hóa.

Endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza để dùng trong phương án này có thể thu được, ví dụ, bằng phương pháp sau.

Đầu tiên, ở bước nuôi cấy tiền đột biến, chủng *Acremonium cellulolyticus* TN (International Patent Microorganisms Depositary, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Số đăng ký: FERM-BP-685; dưới đây được viết tắt là "chủng TN") được cấy vào dịch nuôi cấy có thành phần được thể hiện trong bảng 1 và nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Sau đó, ở bước xử lý đột biến, chủng TN đã nuôi cấy được cấy vạch trên bề mặt môi trường nuôi cấy rắn có thành phần được thể hiện trong bảng 2 và được chiếu xạ với ánh sáng tử ngoại để thu được chủng đã được gây đột biến. Sau đó, chủng đã được gây đột biến được nuôi cấy ở 30°C trong 7 ngày ở bước nuôi cấy sau đột biến.

Bảng 1

| Thành phần                                      | Nồng độ<br>(% khối lượng/thể tích) |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| Rơm                                             | 5,0                                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,2                                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,14                               |
| Ure                                             | 0,4                                |
| Polyoxyetylen sorbitan monooleat                | 0,1                                |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,03                               |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,007                              |
| MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O            | 0,001                              |
| CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,005                              |

Bảng 2

| Thành phần                       | Nồng độ<br>(% khối lượng/thể tích) |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Rom                              | 1,0                                |
| AZCL-He-Xenluloza                | 0,02                               |
| Dung dịch đệm axetat (độ pH = 4) | 20 (mM)                            |
| Aga                              | 2,0                                |

AZCL-HE-CELLULOSE (tên thương mại, của Megazyme International Ireland) chứa trong môi trường nuôi cấy rắn dưới dạng cơ chất hiện màu là chất hiện màu xanh dương khi bị phân giải bởi enzym đường hóa. Do đó, khi chủng này đã được gây đột biến tạo ra enzym đường hóa bằng cách nuôi cấy, AZCL-HE-CELLULOSE bị phân giải bởi enzym đường hóa, và vòng màu xanh dương (dưới đây gọi là "vòng phản ứng AZCL") có kích thước tương ứng với lượng enzym đường hóa được tạo ra xung quanh khuẩn lạc của chủng đã được gây đột biến.

Sau đó, khuẩn lạc có vòng phản ứng AZCL kích thước lớn nhất được chọn dưới dạng chủng cấy, và bước nuôi cấy tiền đột biến, bước xử lý đột biến và bước nuôi cấy sau đột biến được lặp lại một lần nữa. Từ các khuẩn lạc thu được, một vài khuẩn lạc được chọn dựa vào kích thước của chúng và kích thước vòng phản ứng AZCL được tạo ra quanh đó.

Mỗi chủng trong số khuẩn lạc được chọn và chủng TN được cấy vào môi trường mới của môi trường nuôi cấy rắn và nuôi cấy ở 30°C trong 7 ngày. Đo đường kính của khuẩn lạc và đường kính của vòng phản ứng AZCL và tính toán (đường kính của vòng phản ứng AZCL) / (đường kính của khuẩn lạc).

Mỗi chủng trong số khuẩn lạc được chọn và chủng TN còn được cấy vào môi trường mới của dịch nuôi cấy và nuôi cấy ở 30°C, sau đó bắt đầu nuôi cấy trong điều kiện độ pH = 5,5 và 30°C. Vào ngày thứ 7, 10, 11, 12, 13, 14, và 17, hoạt tính phân giải carboxymethylxenluloza (carboxymethylcellulose - CMC) được đo. Hoạt tính phân giải CMC được đo như sau.

Đầu tiên, 190µL dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH = 5,5) và 200µL dung dịch nước CMC 1% theo khối lượng/thể tích (Grade No. 1.02331.0500, của Merck & Co., Inc.)

được thêm vào 10  $\mu$ L mẫu dung dịch nước chứa enzym đường hóa, và phản ứng ở 30°C trong 15 phút.

Sau đó thêm 400  $\mu$ L dung dịch nước chứa 30% khối lượng/thể tích muối Rochelle, 1% khối lượng/thể tích axit dinitrosalixylic, và 1,6% khối lượng/thể tích natri hydroxit vào dung dịch phản ứng và xử lý ở 100°C trong 5 phút. Tiếp theo, sự hấp thụ ánh sáng có bước sóng 540nm của dung dịch thu được được đo và nồng độ đường khử đã tách rửa được đo dựa vào cơ chất chuẩn là glucoza. Đối với vấn đề này, lượng enzym giải phóng 1  $\mu$ mol đường khử / phút được xác định là 1U.

Ngoài các khuẩn lạc được chọn, khuẩn lạc có giá trị (đường kính vòng phản ứng AZCL)/(đường kính khuẩn lạc) và hoạt tính phân giải CMC tính toán như trên cao nhất được chọn là chủng *Acremonium cellulolyticus* H1 (International Patent Microorganisms Depositary, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Số đăng ký: FERM-P-22164; sau đây được viết tắt là "chủng H1") và được sử dụng dưới dạng chủng dùng để tách chiết chế phẩm enzym đường hóa theo phương án của sáng chế.

Trong Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện các đường kính chủng, đường kính vòng phản ứng AZCL, và giá trị (đường kính vòng phản ứng AZCL)/(đường kính khuẩn lạc) đối với chủng H1 và chủng TN. Giá trị hoạt tính phân giải CMC của chủng H1 và chủng TN được thể hiện trong Fig. 3.

Rõ ràng từ Fig. 2A, đường kính vòng phản ứng AZCL đối với khuẩn lạc của chủng H1 lớn hơn so với khuẩn lạc của chủng TN. Do đó, rõ ràng là chủng H1 tạo ra nhiều enzym đường hóa hơn chủng TN.

Hơn nữa, rõ ràng từ Fig. 2B, đối với khuẩn lạc của chủng H1, giá trị của (đường kính vòng phản ứng AZCL)/(đường kính khuẩn lạc) là lớn gấp khoảng hai lần so với khuẩn lạc của chủng TN. Do đó, rõ ràng là chủng H1 có hoạt tính enzym đường hóa trên một thể nấm cao hơn so với chủng TN.

Từ Fig. 3, rõ ràng là chủng H1 có hoạt tính phân giải CMC cao hơn đáng kể so với chủng TN. Do hoạt tính phân giải CMC được dùng dưới dạng chỉ thị thể hiện hoạt tính phân giải xenluloza, rõ ràng là chủng H1 tạo ra enzym đường hóa tốt hơn so với chủng TN.

Tiếp đó, phương pháp tách chiết enzym đường hóa được dùng theo phương án của sáng chế, nghĩa là, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza, từ chủng H1 sẽ được mô tả.

Đầu tiên, chủng H1 được cấy vào dịch nuôi cấy có thành phần được thể hiện trong Bảng 3 và nuôi cấy ở 30°C trong 14 ngày. Dịch nuôi cấy trong đó chủng được nuôi cấy được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ là 0,2 $\mu$ m.

Bảng 3

| Thành phần                                      | Nồng độ<br>(% khối lượng/thể tích) |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| Sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac   | 5,0                                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,5                                |
| Ure                                             | 0,4                                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 2,4                                |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,12                               |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,001                              |
| MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O            | 0,001                              |
| CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,001                              |
| Polyoxyetylen sorbitan monooleat                | 0,1                                |

Phần lọc thu được được tách bằng cột tách đầu tiên (tên thương mại: Bio-Rad Econo-Column, đường kính cột 5,0cm × chiều dài 50,0cm; của Bio-Rad Laboratories, Inc.) được nhồi với môi trường trao đổi anion (tên thương mại: TOYOPEARL QAE-550C; của Tosoh Corporation) thu được các phân đoạn Q1 đến Q12 theo thời gian rửa cột.

Tiếp đó, xử lý nhiệt phân đoạn thu được Q1 ở 50°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm (9460 × g, 20 phút), và lọc dịch nổi thu được bằng màng lọc có kích thước lỗ là 0,2 $\mu$ m. Tách phần lọc thu được bằng cột phân tách thứ hai (tên thương mại: cột Mono S 5,50L; của GE Healthcare Japan) thu được các phân đoạn S1 đến S9 theo thời gian tách rửa. Thu được endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza từ phân đoạn S3. Endoglucanaza là enzym đường hóa chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1.

Tiếp theo, tách phân đoạn Q3 từ cột phân tách thứ ba (tên thương mại: cột XK26/20; đường kính 2,6 cm × chiều dài 20 cm; của GE Healthcare Japan) được nhồi môi trường kỵ nước (tên thương mại: TOYOPEARL Butyl-650M; by Tosoh Corporation) để thu được các phân đoạn B1 đến B8 theo thời gian rửa cột.

Sau đó, thu được xenlobiohydrolaza chứa vùng gắn xenluloza từ phân đoạn B7. Xenlobiohydrolaza là enzym đường hóa chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2. Tiếp theo, thu được  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn kết xenluloza từ phân đoạn B8.  $\beta$ -glucosidaza là enzym đường hóa chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3.

Nghiên cứu độ tương đồng của trình tự axit amin của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza thu được được tiến hành đối với vùng gắn xenluloza dùng cơ sở dữ liệu Pfam làm thư viện motif.

Kết quả là, được biết, đối với xenlobiohydrolaza, trình tự axit amin từ 497 đến 529 trong trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 là vùng gắn xenluloza. Tương tự, được biết là, đối với  $\beta$ -glucosidaza, các trình tự axit amin từ 780 đến 812 trong trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 3 là vùng gắn kết xenluloza. Được biết là endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza.

Tiếp đó, tiến hành đánh giá tính tương đồng trên trình tự axit amin của vùng gắn kết xenluloza của xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza, ví dụ, sử dụng các nghiên cứu BLAST trong trang của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để tìm độ tương đồng của 24/33, nghĩa là 72,7%.

Vùng gắn xenluloza với trình tự axit amin có tính tương đồng cao hơn gắn với vị trí tương tự với xác suất cao hơn, khi chúng gắn kết bề mặt của xenluloza hoặc chuỗi  $\beta$ -1,4-glucan ngắn hơn. Do đó, bằng cách sử dụng xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn xenluloza với trình tự axit amin có độ tương đồng là 72,7%, xác suất có mặt  $\beta$ -glucosidaza trong cùng vùng phản ứng khi xenlobiohydrolaza tạo ra xenlobioza trở nên cao.

Do đó, với chế phẩm enzym đường hóa theo phương án của sáng chế, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza có thể hợp tác để đường hóa hiệu quả hơn.

Đối với chế phẩm enzym đường hóa theo phương án này, hàm lượng tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza thu được ở trên được chọn nằm trong

khoảng từ 30 đến 80% khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm enzym đường hóa. Hơn nữa, chế phẩm enzym đường hóa chứa endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza thu được ở trên ở tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2,5 : 1 : từ 0,2 đến 2,5 được dùng theo phương án của sáng chế.

Nhờ phương pháp tạo ra dung dịch đường hóa theo phương án của sáng chế, các thành phần endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza tạo thành chế phẩm enzym đường hóa được đồng thời thêm vào sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac được điều chỉnh độ pH.

Như vậy, endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza hợp tác để đường hóa xenluloza chứa trong sinh khối có bản chất lignoxenluloza, và do đó có thể sản xuất một cách hiệu quả dung dịch đường hóa với nồng độ cao saccarit như glucoza.

Theo phương án của sáng chế, mặc dù các thành phần endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza tạo thành chế phẩm enzym đường hóa được đồng thời thêm vào sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac được điều chỉnh độ pH, endoglucanaza có thể được thêm riêng trước đó vào sản phẩm tiền xử lý đường hóa đã tách amoniac được điều chỉnh độ pH để tiến hành xử lý đường hóa enzym trong khoảng thời gian xác định trước, và sau đó có thể thêm xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza vào.

Theo phương pháp sản xuất dung dịch đường hóa của sáng chế, bằng cách thêm endoglucanaza đầu tiên, và sau đó thêm xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza, có thể thu được dung dịch đường hóa có nồng độ đường cao với hiệu suất cao hơn.

Theo phương án của sáng chế, mặc dù dùng chế phẩm enzym đường hóa chỉ chứa endoglucanaza không chứa vùng gắn kết xenluloza, xenlobiohydrolaza chứa vùng gắn kết xenluloza, và  $\beta$ -glucosidaza chứa vùng gắn kết xenluloza, nhưng chế phẩm enzym đường hóa có thể còn chứa xylanaza hoặc xylosidaza.

Do chứa xylanaza hoặc xylosidaza, hemixenluloza chứa trong sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza có thể được đường hóa bằng enzym thành xyloza, và do đó tốc độ đường hóa của sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza có thể được cải thiện.

Tiếp theo, các ví dụ và ví dụ so sánh của sáng chế được mô tả.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1**

Trong ví dụ này, đầu tiên nghiền mịn rơm làm sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất, thêm 25% khối lượng nước amoniac vào theo tỷ lệ khối lượng 1:2.5 thu được hỗn hợp cơ chất chứa rơm và amoniac. Tiếp theo, giữ hỗn hợp cơ chất ở nhiệt độ 80°C trong 8 giờ để tiến hành xử lý tiền đường hóa, sau đó tách amoniac và điều chỉnh độ pH đến 4,0. Điều chỉnh nồng độ rơm đến 20% thể tích để thu được sản phẩm tiền xử lý đường hóa của ví dụ này.

Điều chế chế phẩm enzym đường hóa bằng cách trộn lẫn endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2,  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza (endo-1,4-beta-xylanaza A có nguồn gốc từ *Thermoascus aurantiacus*; GenBank ACCESSION No. AAF24127) và  $\beta$ -xylosidaza ( $\beta$ -xylosidaza có nguồn gốc từ *Thermotoga maritima*; của Thermostable Enzyme Laboratory Co., Ltd.) ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 0,3 : 1,0 : 0,7. Thêm chế phẩm vào sản phẩm tiền xử lý đến nồng độ cuối là 2 mg/g rơm, và đưa hỗn hợp vào xử lý đường hóa ở 50°C trong 72 giờ thu được sản phẩm đã xử lý đường hóa. Trong trường hợp này, mặc dù sử dụng xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza có nguồn gốc từ nấm cụ thể, enzym bất kỳ, có hoạt tính endoxylanaza và hoạt tính  $\beta$ -xylosidaza có thể được sử dụng. Sau đó, xử lý nhiệt dung dịch đường hóa ở 95°C trong 5 phút, ly tâm ở 15,760  $\times$  g, 4°C trong 5 phút, và chuyển dịch nổi vào ống Eppendorf 1,5 mL mới. Sau khi lọc bằng máy lọc có kích thước lỗ 0,2 $\mu$ m, đo nồng độ đường bằng HPLC.

Đo nồng độ đường bằng HPLC kèm dụng cụ tách (tên thương mại: Waters 2695; của Nihon Waters K. K.), máy dò RI (tên thương mại: Waters 2414; của Nihon Waters K. K.), và cột phân tách (tên thương mại: cột HPX-87P; của Bio-Rad Laboratories, Inc.) trong điều kiện nhiệt độ cột là 85°C, và nhiệt độ máy dò là 40°C sử dụng nước siêu tinh khiết làm chất tách rửa ở lưu lượng 0,6mL/phút. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 4. Trong Fig. 4, tổng glucoza và xyloza được thể hiện dưới dạng nồng độ đường.

#### Ví dụ so sánh 1

Trong ví dụ so sánh này, sử dụng dung dịch đường hóa đã được tạo ra, chính xác như trong ví dụ 1, ngoại trừ sử dụng enzym đường hóa có bán ngoài thị trường (tên thương mại: Acremonium xenlulaza; của Meiji Seika Pharma Co., Ltd.); và đo nồng độ glucoza của dung dịch đường hóa. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 4.

Như thể hiện trong Fig. 4, nồng độ đường của dung dịch đường hóa của ví dụ được tạo ra bằng cách sử dụng chế phẩm enzym đường hóa chứa endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza là 3,8% khối lượng/thể tích, và nồng độ đường của dung dịch đường hóa của Ví dụ so sánh được tạo ra bằng cách sử dụng Acremonium xenlulaza (tên thương mại) là 2,3% khối lượng/thể tích.

Do đó, chế phẩm enzym đường hóa của Ví dụ, nồng độ đường của dung dịch đường hóa thu được bằng cách xử lý đường hóa bằng enzym trong khoảng thời gian được xác định trước có thể tăng lên rõ ràng khoảng 1,7 lần so với enzym đường hóa của ví dụ so sánh. Nói cách khác, chế phẩm enzym đường hóa của Ví dụ với lượng ít hơn 1,7 lần so với lượng enzym đường hóa của ví dụ so sánh có thể sản xuất dung dịch đường hóa với nồng độ đường tương đương, chứng minh rõ ràng hiệu suất đường hóa cao với lượng dùng thấp.

#### Ví dụ 2

Tiếp theo, nghiên cứu nồng độ tổng của enzym theo sáng chế.

#### Ví dụ 2-1

Trong ví dụ này, tiến hành xử lý đường hóa chính xác như ví dụ 1, ngoại trừ chế phẩm enzym đường hóa được điều chế bằng cách trộn lẫn endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, và  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3 ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 0,3 để tạo thành 35,1% tổng khối lượng enzym, để sản xuất sản phẩm xử lý đường hóa, đo nồng độ glucoza của sản phẩm này. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

#### Ví dụ 2-2

Trong ví dụ này, tiến hành xử lý đường hóa chính xác như Ví dụ 2-1, ngoại trừ chế phẩm enzym đường hóa được điều chế để endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, và  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3 tạo thành 56,7% tổng khối lượng enzym, để sản xuất sản phẩm xử lý đường hóa, đo nồng độ glucoza của sản phẩm. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

#### Ví dụ 2-3

Trong ví dụ này, tiến hành xử lý đường hóa chính xác như Ví dụ 2-1, ngoại trừ chế phẩm enzym đường hóa được điều chế để endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, và  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3 tạo thành 78,4% tổng khối lượng enzym, để sản xuất sản phẩm xử lý đường hóa, đo nồng độ glucoza của sản phẩm. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

#### Ví dụ so sánh 2-1

Trong ví dụ so sánh này, tiến hành xử lý đường hóa chính xác như Ví dụ 2-1, ngoại trừ chế phẩm enzym đường hóa được điều chế để endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, và  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3 tạo thành 13,5% tổng khối lượng enzym, để sản xuất sản phẩm xử lý đường hóa, đo nồng độ glucoza của sản phẩm. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

#### Ví dụ so sánh 2-2

Trong ví dụ so sánh này, tiến hành xử lý đường hóa chính xác như ví dụ 2-1, ngoại trừ chế phẩm enzym đường hóa được điều chế để endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, và  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3 tạo thành 100% tổng khối lượng enzym, để sản xuất sản phẩm xử lý đường hóa, đo nồng độ glucoza của sản phẩm. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

Như thể hiện trong ví dụ so sánh 2-1 trong Fig. 5, nếu phần trăm nồng độ endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza của sáng chế thấp bằng 13,5% so với tổng khối lượng enzym, thì nồng độ glucoza của sản phẩm xử lý đường hóa cũng thấp bằng 2,0%. Điều này có thể hiểu được bởi vì hiệu quả đường hóa thấp do nồng độ enzym thấp.

Điều đó không có nghĩa là nồng độ tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza theo sáng chế càng cao thì càng tốt. Nhìn từ Ví dụ so sánh 2-2, nếu chế phẩm enzym đường hóa được điều chỉnh đến 100% tổng khối lượng enzym, thì nồng độ glucoza của sản phẩm xử lý đường hóa giảm xuống 1,5%.

Sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza được tạo thành bởi xenluloza và hemixenluloza, tồn tại phủ kín bề mặt xenluloza. Người ta tin rằng, nếu hemixenluloza có mặt, sự phân giải

hemixenluloza tăng lên và quá trình đường hóa đạt hiệu quả hơn, và nồng độ đường của sản phẩm xử lý đường hóa tăng lên trong khoảng thời gian ngắn. Do đó, với sự có mặt của hemixenlulaza như xylanaza ngoài endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza, việc xử lý đường hóa có thể được thực hiện hiệu quả hơn.

Do đó, nồng độ tổng của endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng 30 đến 80% khối lượng. Nếu nồng độ tổng của enzym nằm trong khoảng này, thì hiệu quả là cao và nồng độ glucoza của sản phẩm xử lý đường hóa không ít hơn khoảng 2,4%.

### Ví dụ 3

Tiếp đó, nghiên cứu tỷ lệ khối lượng giữa các enzym trong chế phẩm enzym đường hóa.

#### Ví dụ 3-1

Điều chế chế phẩm enzym đường hóa bằng cách trộn endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2,  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza ở tỷ lệ khối lượng là 0,2 : 1 : 0,2 : 0,2 : 0,2. Thêm chế phẩm vào sản phẩm tiền xử lý đến nồng độ cuối cùng là 2mg/g rom, và đưa hỗn hợp vào xử lý đường hóa ở 50°C trong 72 giờ thu được sản phẩm đã xử lý đường hóa. Tiến hành điều chỉnh dung dịch đường hóa, và phép đo nồng độ đường được tiến hành như trong ví dụ 1. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong Bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-2

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2,  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 0,3 : 1,0 : 0,7. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong Bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-3

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2,  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 1,0 : 0,7 : 0,3. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-4

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, a  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 0,5 : 1 : 2,5 : 0,5 : 0,5. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-5

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, a  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 1,0 : 1 : 0,3 : 0,7 : 0,3. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong Bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-6

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, a  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 2,5 : 1 : 0,5 : 0,5 : 0,5. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-7

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như

nêu trong SEQ ID NO:2, a  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 0,3 : 1,3 : 0,3. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

#### Ví dụ 3-8

Tiến hành đo nồng độ đường như trong ví dụ 1 ngoại trừ endoglucanaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, xenlobiohydrolaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2, a  $\beta$ -glucosidaza chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:3, xylanaza và  $\beta$ -xylosidaza được trộn ở tỷ lệ khối lượng là 0,3 : 1 : 0,3 : 0,3 : 1,3. Tỷ lệ trộn giữa các enzym tương ứng được thể hiện trong bảng 4, và kết quả được thể hiện trong Fig. 6.

Bảng 4

|           | Endoglucanaza | Xenlobiohydrolaza | $\beta$ -glucosidaza | Xylanaza | $\beta$ -xylosidaza |
|-----------|---------------|-------------------|----------------------|----------|---------------------|
| Ví dụ 3-1 | 0,2           | 1,0               | 0,2                  | 0,2      | 0,2                 |
| Ví dụ 3-2 | 0,3           | 1,0               | 0,3                  | 1,0      | 0,7                 |
| Ví dụ 3-3 | 0,3           | 1,0               | 1,0                  | 0,7      | 0,3                 |
| Ví dụ 3-4 | 0,5           | 1,0               | 2,5                  | 0,5      | 0,5                 |
| Ví dụ 3-5 | 1,0           | 1,0               | 0,3                  | 0,7      | 0,3                 |
| Ví dụ 3-6 | 2,5           | 1,0               | 0,5                  | 0,5      | 0,5                 |
| Ví dụ 3-7 | 0,3           | 1,0               | 0,3                  | 1,3      | 0,3                 |
| Ví dụ 3-8 | 0,3           | 1,0               | 0,3                  | 0,3      | 1,3                 |

Như thể hiện trong Fig. 6, nếu endoglucanaza, xenlobiohydrolaza, và  $\beta$ -glucosidaza theo sáng chế được trộn ở tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2,5 : 1 : 0,2 đến 2,5, phản ứng đường hóa có thể được thực hiện rất hiệu quả luôn dẫn đến nồng độ đường cuối cùng là 3,0% hoặc cao hơn.

Lượng bổ sung của xylanaza hoặc xylosidaza tốt hơn là từ 0,2 đến 1,3 so với tỷ lệ khối lượng 1 của xenlobiohydrolaza.

Chế phẩm enzym mà có thể đường hóa cơ chất rất hiệu quả dù lượng enzym nhỏ bây giờ có thể được đề xuất theo sáng chế, bằng cách dùng nhiều enzym xem xét sự gắn của chúng với cơ chất, và nghiên cứu chi tiết tỷ lệ khối lượng giữa chúng.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chế phẩm enzym đường hóa để đưa sinh khối trên cơ sở lignoxenluloza dưới dạng cơ chất vào xử lý đường hóa, chế phẩm này chứa hỗn hợp của:  
endoglucanaza không chứa miền gắn kết xenluloza như nêu trong SEQ ID NO:1;  
xenlobiohydrolaza chứa miền gắn kết xenluloza như nêu trong SEQ ID NO:2; và  
 $\beta$ -glucosidaza chứa miền gắn kết xenluloza như nêu trong SEQ ID NO:3;  
trong đó endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza tổng cộng chiếm từ 30% đến 80% về khối lượng của toàn bộ enzym có mặt trong chế phẩm enzym đường hóa, và  
trong đó endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza có mặt trong chế phẩm enzym đường hóa với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2,5:1:0,2 đến 2,5.
2. Chế phẩm enzym đường hóa theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa một trong hai hoặc cả hai xylanaza và xylosidaza.
3. Chế phẩm enzym đường hóa theo điểm 1, trong đó endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza thu được từ chủng *Acremonium cellulolyticus* H1 có khả năng đồng hóa xenluloza.
4. Chế phẩm enzym đường hóa theo điểm 1, trong đó endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và  $\beta$ -glucosidaza được tạo ra bằng cách nuôi cấy chủng *Acremonium cellulolyticus* H1.

1/6

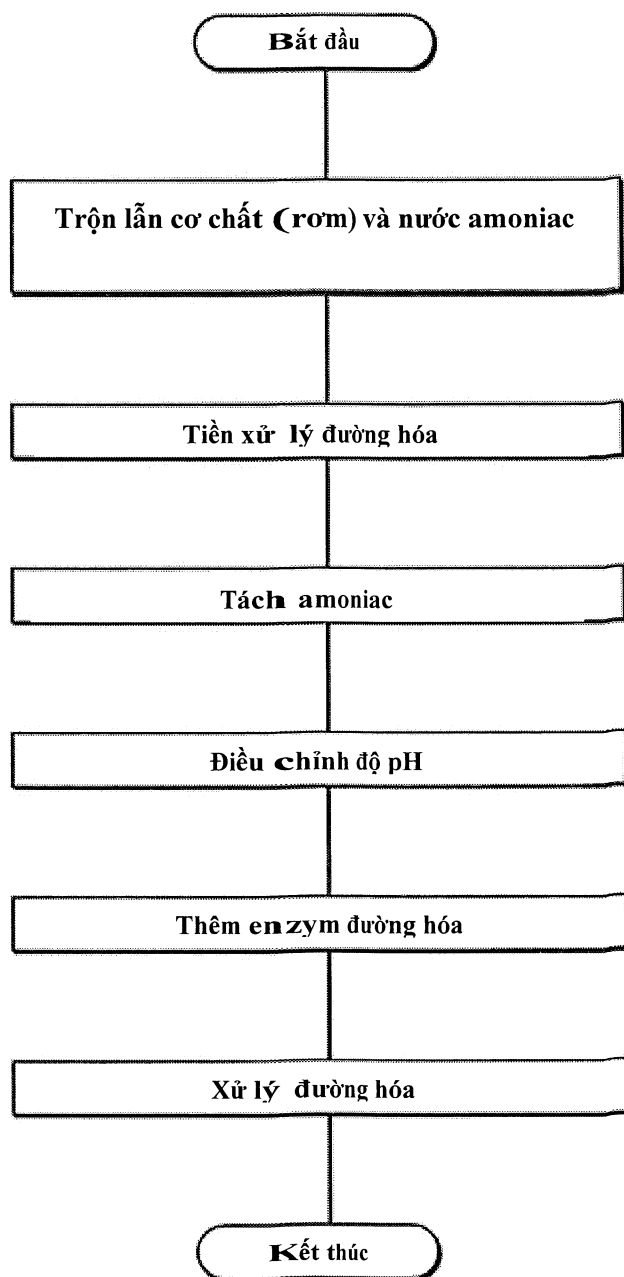
**FIG.1**

FIG.2A

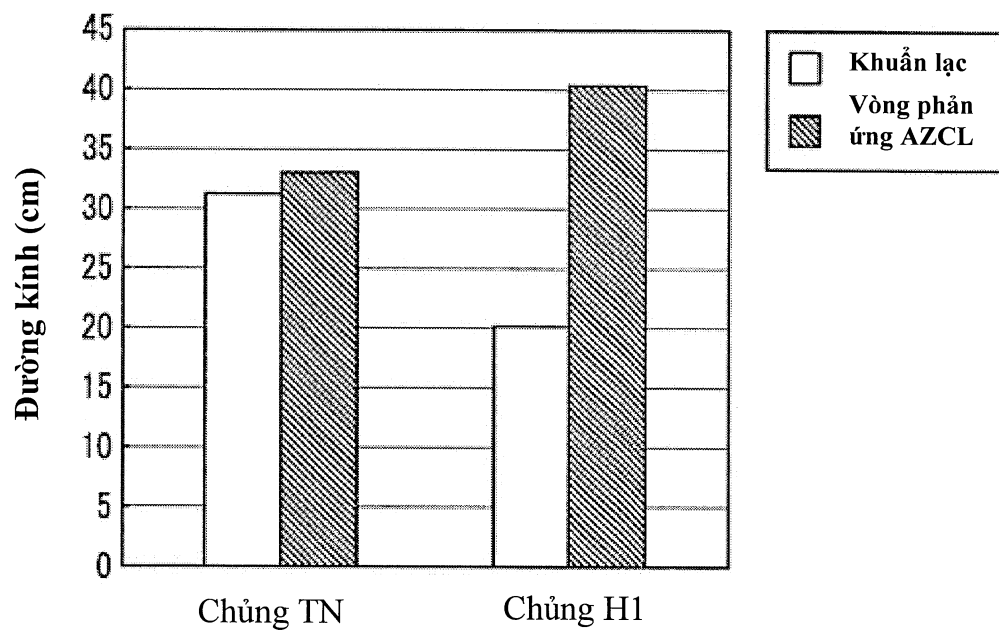


FIG.2B

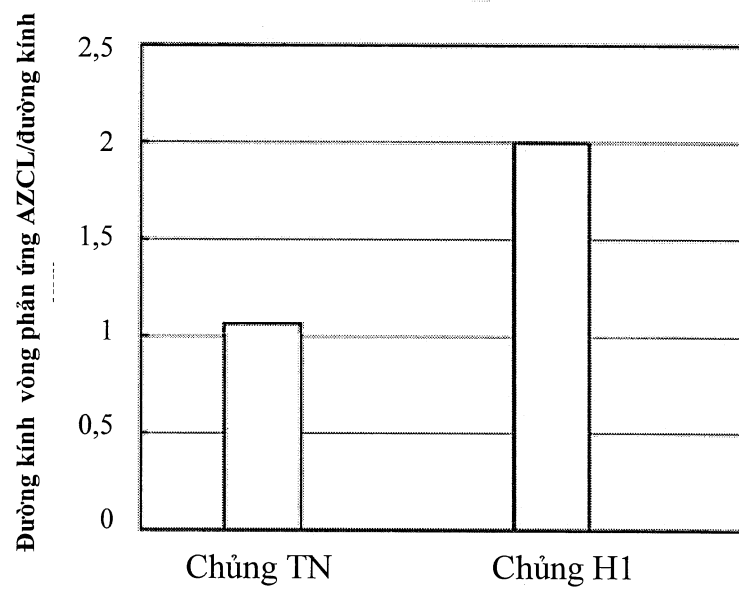


FIG.3

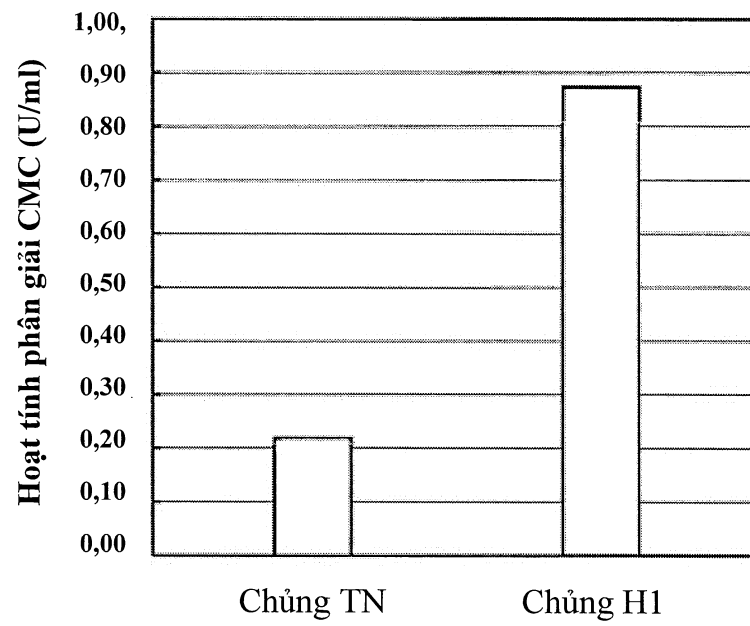


FIG.4

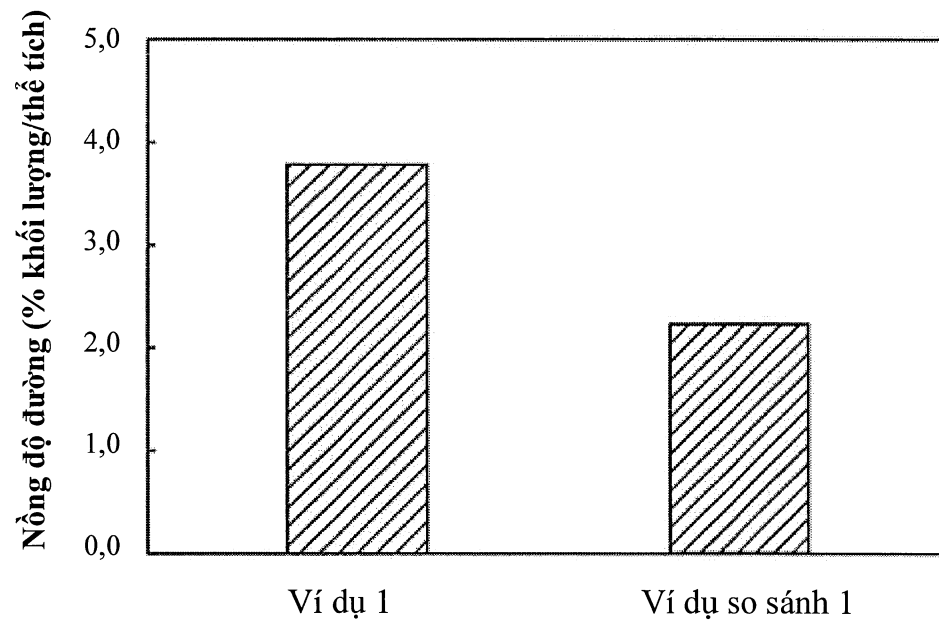


FIG.5

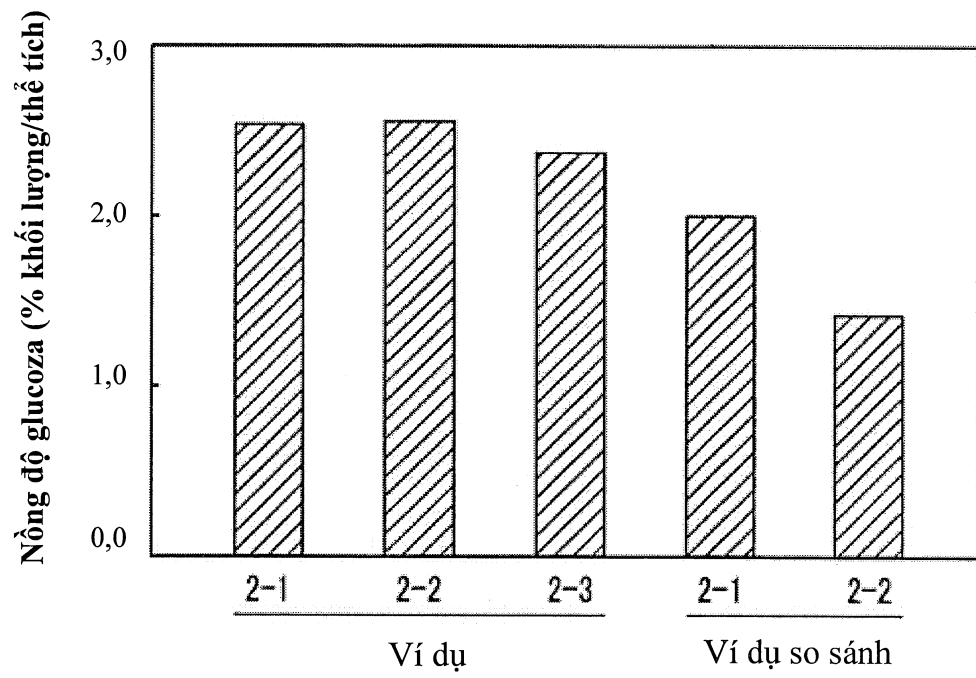
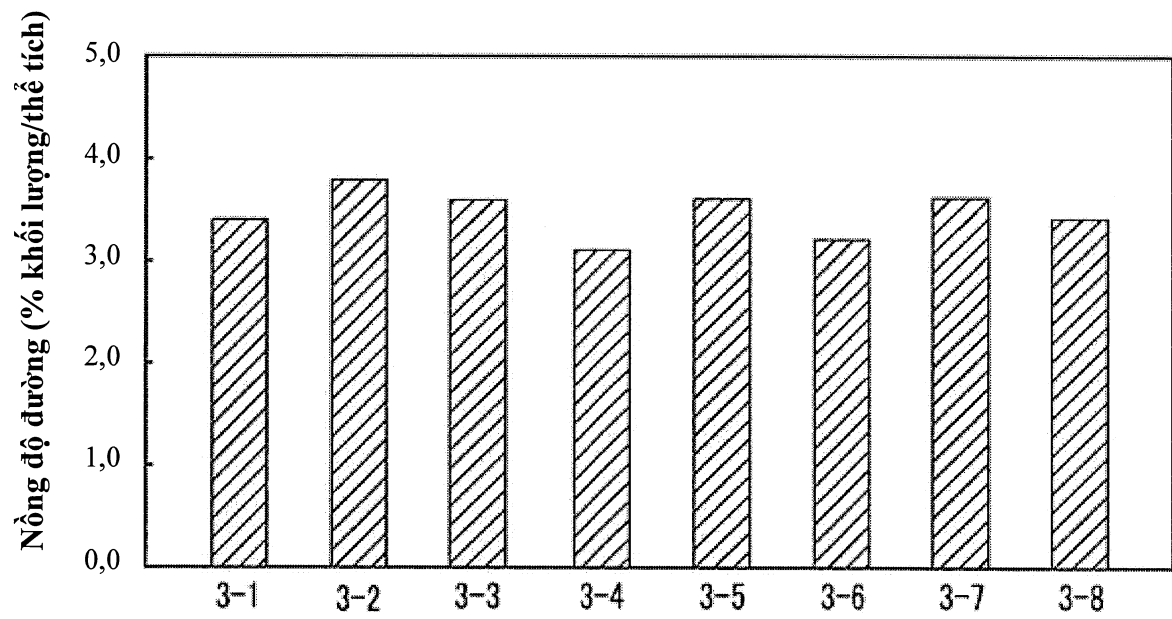


FIG.6



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

&lt;110&gt; HONDA MOTOR CO., LTD.

&lt;120&gt; CHẾ PHẨM ENZYM ĐƯỜNG HÓA

&lt;130&gt; HW5622PX

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Acremonium cellulolyticus

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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

<210> 2  
 <211> 529  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium cellulolyticus

<400> 2

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 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> 3  
 <211> 813  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium cellulolyticus

<400> 3

Met Tyr Ser Ala Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Thr Pro Ile Val  
 1 5 10 15

Ser Ala Gln Ser Ala Ser Trp Ser Ala Ala Tyr Ser Lys Ala Thr Ala  
 20 25 30

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

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 260                                                             | 265 | 270     |
| Asp Tyr Ser Asp Thr Pro Ser Ser Val Leu Trp Gly Gln Asn Leu Ala |     |         |
| 275                                                             | 280 | 285     |
| Asn Ala Ile Ser Ser Gly Gln Val Ala Gln Ser Arg Leu Asp Asp Met |     |         |
| 290                                                             | 295 | 300     |
| Val Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Val Gly Gln Asp Gln Gly |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Phe Pro Ala Val Ala Phe Asn Ser Trp Thr Gly Gly Gln Ala Ser Val |     |         |
| 325                                                             | 330 | 335     |
| Asn Val Thr Ser Asn His Asn Gln Val Ala Arg Ala Val Ala Arg Asp |     |         |
| 340                                                             | 345 | 350     |
| Ser Ile Val Leu Leu Lys Asn Thr Asn Ser Thr Leu Pro Leu Asn Lys |     |         |
| 355                                                             | 360 | 365     |
| Pro Ser Ser Ile Ala Ile Ile Gly Thr Asp Ala Gln Thr Asn Pro Ser |     |         |
| 370                                                             | 375 | 380     |
| Gly Pro Asn Ala Cys Thr Asp Arg Gly Cys Asp Thr Gly Thr Leu Ala |     |         |
| 385                                                             | 390 | 395 400 |
| Met Gly Trp Gly Ser Gly Thr Cys Gln Phe Pro Tyr Leu Thr Asp Pro |     |         |
| 405                                                             | 410 | 415     |
| Leu Thr Ala Ile Lys Thr Arg Ala Ala Ser Asp Gly Thr Thr Ile Thr |     |         |
| 420                                                             | 425 | 430     |
| Thr Ser Ile Ser Asp Asn Gly Ser Ala Gly Ala Ser Val Ala Gln Ser |     |         |
| 435                                                             | 440 | 445     |
| Ala Glu Tyr Ala Ile Val Phe Ile Asn Ser Asp Ser Gly Glu Gly Tyr |     |         |
| 450                                                             | 455 | 460     |
| Ile Thr Val Glu Gly Val Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp |     |         |
| 465                                                             | 470 | 475 480 |
| His Ser Gly Asn Ala Leu Val Gln Ser Val Ala Ala Val Asn Lys Lys |     |         |
| 485                                                             | 490 | 495     |

Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Ile Leu Glu Thr Ile  
500 505 510

Leu Ala Gln Pro Asn Val Val Ala Val Val Trp Ala Gly Ile Pro Gly  
515 520 525

Gln Glu Ser Gly Ser Ala Leu Thr Asp Ile Leu Tyr Gly Ser Thr Ala  
530 535 540

Pro Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Ala Lys Gln Ala Ser Asp Tyr  
545 550 555 560

Gly Thr Ala Val Val Ser Gly Ser Asp Asn Tyr Pro Glu Gly Leu Phe  
565 570 575

Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Ser Asn Ile Glu Pro Arg Tyr Glu  
580 585 590

Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Gly Tyr Thr Asn Leu Ala  
595 600 605

Ile Asp Ile Thr Val Ser Thr Gly Pro Thr Thr Gly Gln Ile Val Pro  
610 615 620

Gly Gly Pro Ser Asp Leu Phe Glu Ser Val Gly Thr Val Thr Val Gln  
625 630 635 640

Val Ala Asn Thr Gly Ser Val Ala Gly Ser Glu Val Ala Gln Leu Tyr  
645 650 655

Ile Gly Leu Pro Ser Ser Ala Pro Ser Ser Pro Pro Lys Gln Leu Arg  
660 665 670

Gly Phe Asp Lys Leu Ser Leu Ala Ala Gly Ala Ser Gly Thr Ala Thr  
675 680 685

Phe Asp Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Val Ser Lys Gln  
690 695 700

Lys Trp Val Val Pro Ser Gly Ala Phe Thr Val Tyr Val Gly Ala Ser  
705 710 715 720

Ser Arg Asp Ile Arg Leu Gln Gly Thr Phe Thr Pro Gly Gly Ser Ser  
725 730 735

Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ser Ser Lys Thr Ser Thr Thr Ile Ser Thr  
740 745 750

Ser Val Thr Thr Ser Ser Ser Thr Thr Ala Lys Thr Thr Thr Thr Ser  
755 760 765

Ser Thr Thr Ser Ser Ala Gly Pro Thr Gln Thr Pro Tyr Gly Gln Cys  
770 775 780

Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val Cys Ser Ser Gly Trp Thr  
785 790 795 800

Cys Lys Val Thr Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Gln  
805 810

—