



(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)



1-0033386

(51)⁷ C12N 1/16; A23F 5/00; A23L 19/12; (13) B
A23L 31/10; A23L 33/14; C12Q 1/34;
A23L 5/20; C12N 15/00; C12N 9/82;
C12Q 1/04; A21D 8/04; A23L 5/00

(21) 1-2018-00569

(22) 06/07/2016

(86) PCT/CA2016/050788 06/07/2016

(87) WO 2017/004715 12/01/2017

(30) 62/189,547 07/07/2015 US

(45) 26/09/2022 414

(43) 25/07/2018 364A

(73) RENAISSANCE BIOSCIENCE CORP. (CA)

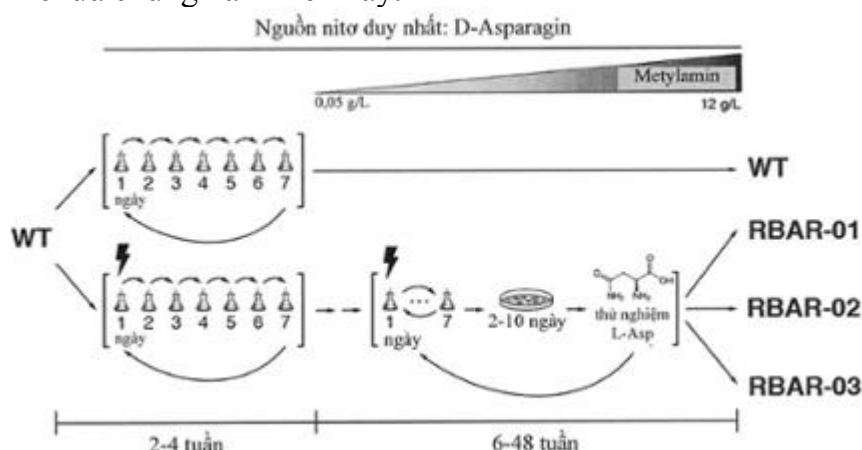
410-2389 Health Sciences Mall, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada

(72) TURGEON, Zachari J. (CA); SWANSON, Jessica Marie (CA); DAHABIEH, Matthew S. (CA); HUSNIK, John I. (CA).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHŨNG NẤM MEN CÔNG NGHIỆP ĐƯỢC PHÂN LẬP PHÂN GIẢI L-ASPARAGIN TRONG ĐIỀU KIỆN KHÔNG GÂY CẢM ỨNG VÀ THỰC PHẨM CÓ NỒNG ĐỘ ASPARAGIN HOẶC ACRYLAMIT GIẢM CHỨA CHŨNG NẤM MEN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng nấm men công nghiệp được phân lập phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng và thực phẩm có nồng độ asparagin hoặc acrylamit giảm chứa chủng nấm men này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm và phương pháp làm giảm nồng độ acrylamit trong thực phẩm và thực phẩm có lượng acrylamit giảm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng nấm men tiến hóa có khả năng làm giảm asparagin, và theo đó là acrylamit, tăng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Acrylamit (AA) là hóa chất công nghiệp được sử dụng để điều chế polyme polyacrylamit dùng trong xử lý nước thải, sản xuất giấy, xử lý quặng, thu hồi dầu, nghiên cứu khoa học và xử lý thuốc nhuộm/vải. Mặc dù được sử dụng rộng rãi, nhưng AA rất độc đối với các hệ sinh học, như được chứng minh bằng nhiều nghiên cứu *in vitro*, *in vivo* và trên mô hình động vật (chuột cống và chuột nhắt) (1-6). Các dữ liệu này cùng nhau chứng tỏ chắc chắn rằng AA - và chất chuyển hóa có hoạt tính của nó là glycidamit - là hóa chất gây độc có tiềm năng gây đột biến, gây độc tế bào và gây độc thần kinh.

Theo kết quả về độc tính đã được chứng minh ở các hệ không phải là người, AA được Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế của Tổ chức Y tế thế giới (WHO-IARC: World Health Organization's International Agency for Research on Cancer) phân loại vào năm 1994 là một chất gây ung thư nhóm 2A – các hợp chất thuộc nhóm này được liệt kê là ‘có khả năng gây ung thư cho người’ dựa trên ‘bằng chứng đầy đủ về khả năng gây ung thư ở các động vật thí nghiệm và bằng chứng mạnh mẽ về việc quá trình gây ung thư được điều tiết bởi một cơ chế mà cũng hoạt động ở người’.

Vào năm 2002, AA được báo cáo là xuất hiện trong nhiều thực phẩm thông thường của người do các phản ứng nâu hóa Maillard xảy ra trong quá trình nấu nướng (7-9). Cụ thể hơn, AA tạo thành nhanh chóng khi axit amin asparagin phản ứng với các đường khử trong các thực phẩm hoặc thức ăn chứa tinh bột khi chúng tiếp xúc với nhiệt độ bằng hoặc lớn hơn 120°C (ví dụ, rán, nướng, rang, v.v.). Do đó, AA được phát hiện thấy với lượng đáng kể trong nhiều loại thực phẩm bao gồm bánh mì (làm từ

tất cả các loại bột ngũ cốc), khoai tây, sản phẩm từ khoai tây (khoai tây chiên, khoai tây lát mỏng, bột và vụn khoai tây), cà phê, ngũ cốc, rau củ, v.v. (10-19).

Do sự phổ biến của nó trong thực phẩm, nên sự tiếp xúc thông qua ăn uống của con người với AA là rất phổ biến. Tuy nhiên, hiện tại không có sự nhất trí khoa học về vai trò trực tiếp của AA trong chế độ ăn uống đối với việc gây ung thư ở người. Mặc dù có hơn 30 nghiên cứu dịch tễ học đã được hoàn thành cho đến nay (20), nhưng nhiều trong số các nghiên cứu này đi tới kết luận không nhất quán hoặc không rõ ràng, do đó chỉ hỗ trợ cho mối quan hệ tương quan giữa sự tiếp xúc nhiều với AA trong chế độ ăn uống và nhiều loại bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư thận, ung thư màng trong tử cung và ung thư buồng trứng (20).

Mặc dù không có sự nhất trí khoa học về vai trò của AA trong chế độ ăn uống đối với việc gây ung thư, nhưng nhiều chính phủ và cơ quan quản lý trên thế giới đã coi việc đánh giá và giảm thiểu rủi ro của AA trong chế độ ăn uống là một ưu tiên quan trọng. Trên thực tế, Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA: European Food Safety Authority), WHO, Cục quản lý dược phẩm và thực phẩm Hoa Kỳ (US FDA: US Food and Drug Administration), Cơ quan đánh giá nguy cơ sức khỏe môi trường California (OEHHA: California Office of Environmental Health Hazard Assessment) và Bộ y tế Canada (Health Canada) đều coi sự có mặt của AA trong thực phẩm là mối lo ngại chính và khuyến nghị làm giảm mức AA trong thực phẩm và đồ uống đến mức thấp nhất có thể đạt được một cách hợp lý (ALARA: As Low As Reasonably Achievable). Ngoài ra, cả EFSA (Acrylamide Toolbox - <http://www.fooddrinkeurope.eu/publications/category/toolkits/>) và US FDA (<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm2006782.htm>) đều xuất bản các tài liệu hướng dẫn tập trung vào ngành công nghiệp nhằm làm giảm AA trong thực phẩm và đồ uống.

Các phương pháp hiện có để làm giảm AA dựa trên hai nguyên lý cơ bản: 1) giảm thiểu sự tạo thành AA bằng các thực hành chế biến thực phẩm (giới hạn thời gian nấu và nhiệt độ) và 2) loại bỏ tiền chất của AA là asparagin. Quan trọng là, chỉ có cách thứ hai mới làm giảm được lượng AA tiềm ẩn trong thực phẩm, vì AA có thể được tạo thành trong quá trình nấu nướng bởi người tiêu dùng cuối. Trong cả thực phẩm được sản xuất thương mại và được chế biến tại nhà, hàm lượng AA đều tăng đáng kể theo thời gian nấu và nhiệt độ (21). Do đó, phương pháp dựa vào việc loại bỏ asparagin để

làm giảm AA được xem là tốt hơn vì nó loại bỏ được khả năng tạo thành AA trong các giai đoạn sau.

Hiện đã có nhiều phương pháp để làm giảm hàm lượng AA trong thực phẩm. Các phương pháp này bao gồm việc tạo ra enzym asparaginaza (Acrylaway®, Novozymes, Đan Mạch và PreventASe, DSM, Hà Lan) (<http://www.acrylaway.com/en/Pages/default.aspx>; http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en_US/products/enzymes/baking/preventase.html), lên men với nấm men quảng canh (22), thêm glyxin vào bột nhào trước khi lên men (23, 24), ngâm khoai tây trong canxi clorua trước khi rán (25), thay thế các đường khử bằng sucroza (26), tối ưu hóa tổng quát các điều kiện chế biến, như nhiệt độ, độ pH và hàm lượng nước (25, 27, 28), nghiên cứu về các lựa chọn nguyên liệu thô khác (27) và lên men với vi khuẩn axit lactic (Zerabac và Zeracid, Zeracryl, Na Uy; <http://www.zeracryl.com/>). Ngoài ra, giống khoai tây có lượng asparagin thấp đã được mô tả gần đây (29-31), tuy nhiên giống này được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp, và do đó được coi là sinh vật cải biến về mặt di truyền (GMO) (<http://www.simplotplantsciences.com/>). Tất cả các phương pháp được liệt kê này đều không đủ ở một mức độ nào đó hoặc có các vấn đề cố hữu khiến chúng trở nên không thực tế trong quá trình sản xuất thực phẩm, bao gồm chi phí, ảnh hưởng đến các tính chất cảm quan của thực phẩm và/hoặc làm giảm acrylamit không đủ trong điều kiện chế biến thực phẩm trên quy mô công nghiệp.

Men bánh mỳ (*Saccharomyces cerevisiae*) có khả năng tiêu thụ/phân giải các tiền chất của AA, là asparagin, và các đường khử một cách tự nhiên. Tuy nhiên, trong hầu hết các điều kiện phổ biến trong chế biến thực phẩm, bộ máy tế bào cần để phân giải asparagin lại bị tắt đi. Do đó, trừ khi được sử dụng với thời gian và điều kiện rất đặc hiệu, các chủng nấm men thông thường đều không có hiệu quả trong việc làm giảm AA. Để khắc phục vấn đề này, các tác giả sáng chế trước đây đã phát triển một công nghệ dựa trên men bánh mỳ cải biến về mặt di truyền (GMO) mới để làm giảm mức acrylamit trong thực phẩm (US 2012/0321744 A1). Công nghệ này bao gồm chủng đặc hiệu là *S. cerevisiae* - được thiết kế bằng công nghệ ADN tái tổ hợp - để phân giải asparagin và theo đó là acrylamit. Mặc dù chủng nấm men được mô tả trong Công bố đơn Mỹ số 2012/0321744 A1 có hiệu quả trong việc làm giảm acrylamit trong nhiều loại thực phẩm, nhưng việc sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để phát

triển nó đã phân loại chủng này thành sinh vật cải biến về mặt di truyền (GMO) tự nhân bản. Sự phân định này làm hạn chế một cách cố hữu việc chấp nhận nó trong các ngành công nghiệp và ở các nước mà sản phẩm GMO bị nhìn nhận một cách tiêu cực và/hoặc bị luật pháp chống lại.

Trong *S. cerevisiae*, các gen chịu trách nhiệm cho việc phân giải asparagin là *ASP1* và *ASP3*, các gen này mã hóa asparaginaza I nội bào và asparaginaza II gắn thành tế bào ngoại bào, một cách tương ứng (32-34). *ASP1* tồn tại dưới dạng gen bản sao đơn lẻ (35), trong khi *ASP3* tồn tại dưới dạng locus lặp lại liên tiếp bội bốn (36). Đáng quan tâm là, locus *ASP3* không phải là nguyên gốc đối với *S. cerevisiae*, mà đạt được thông qua quá trình tiến hóa bằng cách chuyển gen ngang từ loài nấm men không phải là *Saccharomyces* (*Wickerhamomyces*) (34).

Đã biết rõ là *ASP1* được biểu hiện một cách cơ định, nhưng chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc sử dụng asparagin nội bào, hơn là việc tìm kiếm asparagin ngoại bào để lấy nitơ (32, 33). Như vậy, chỉ riêng hoạt tính *ASP1* thì không đủ cho nấm men để có thể phân giải lượng đáng kể của asparagin nhằm mục đích làm giảm AA trong thực phẩm. Để phân giải asparagin ngoại bào, nấm men phải biểu hiện asparaginaza II, tuy nhiên *ASP3* phải chịu các cơ chế kiểm soát chọn lọc việc sử dụng nitơ trong nấm men, thường được gọi là sự ức chế sản phẩm dị hóa nitơ (NCR: nitrogen catabolite repression) (37-41). Thông thường, NCR dùng để chỉ các cơ chế phân tử - bao gồm các hệ thống cảm biến và các mạch điều hòa phiên mã - mà cho phép sự biểu hiện gen biệt hóa của các permeaza và các enzym dị hóa cần để phân giải các nguồn nitơ. Cụ thể hơn, trong các giống cây được cho sinh trưởng trên nhiều nguồn nitơ, NCR cho phép nấm men dị hóa lần lượt các nguồn nitơ khác nhau, dựa vào sự phân cấp sử dụng sinh hóa tương ứng của chúng (32, 42). Trong trường hợp của *ASP3*, đã biết rằng, giống như các gen được điều hòa bởi NCR khác, enzym này có thể được gây cảm ứng trong quá trình sinh trưởng trong điều kiện thiếu hụt hoặc nghèo nitơ - bất kể dạng nguồn nitơ là gì - miễn là nguồn axit amin nội bào bị cạn kiệt đến mức cận ngưỡng (36, 37, 39, 40).

Phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi dùng để chỉ sự thích nghi liên tiếp hoặc lặp lại của sinh vật đối với điều kiện và/hoặc môi trường sinh trưởng mới. Để thực hiện điều này, các đột biến ngẫu nhiên được đưa vào sinh vật, sau đó xác định đặc điểm của nguồn biến thể lớn và chọn lọc các cá thể có các tính trạng

mong muốn. Theo cách này, phương pháp chọn lọc nhân tạo được sử dụng để nhận diện sự biến đổi di truyền mong muốn được tăng tốc thông qua quá trình gây đột biến (43). Kỹ thuật này được sử dụng phổ biến trong vi sinh vật học để tạo ra hoặc tăng cường các tính trạng mong muốn trong các vi khuẩn liên quan về mặt công nghiệp, và cụ thể hơn là có lịch sử sử dụng lâu dài trong ngành công nghiệp thực phẩm (43-56). Quan trọng là, phương pháp gây tiến hóa thích nghi không bao gồm việc sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp; do đó, các sinh vật được tạo ra bằng phương pháp gây tiến hóa thích nghi không phải là sinh vật cải biến về mặt di truyền (GMO) (http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/new/index_en.htm), và như vậy không phải chịu các quy định pháp luật hạn chế về thực phẩm GMO và các vấn đề về sự chấp nhận của người tiêu dùng.

Theo bản chất, phương pháp gây tiến hóa thích nghi luôn chọn lọc cách tối ưu để hoàn thành nhiệm vụ (52). Trên khắp các quần thể lớn và qua nhiều thế hệ, đột biến ngẫu nhiên cho phép tiến hóa để “thử” mọi giải pháp có thể có cho một vấn đề. Chỉ có các giải pháp mà làm tăng sự phù hợp - hoặc ít nhất là không bất lợi một cách công khai - mới tồn tại đến thế hệ sau (52). Khái niệm này trở nên đặc biệt quan trọng khi xem xét rằng sự thích nghi với môi trường thích hợp thường đi kèm với một chi phí cho sự phù hợp khi ở bên ngoài môi trường đó (52). Như vậy, phương pháp gây tiến hóa thích nghi cho phép các sinh vật đạt được trạng thái cân bằng phù hợp với môi trường của chúng. Trạng thái cân bằng này được tạo thành từ các đột biến nguyên nhân cho sự thích nghi quan tâm, cũng như các đột biến đền bù mà chống lại sự mất phù hợp được khái quát hóa nhiều nhất có thể. Theo cách này, các cơ chế tiến hóa thích nghi có thể thường tốt hơn so với các phương pháp cụ thể được nhắm tới như thiết kế ADN tái tổ hợp.

Giống như các vi sinh vật khác, men bánh mỳ rất dễ bị gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi. Trên thực tế, kỹ thuật này đã được sử dụng rộng rãi để cải biến các tính trạng liên quan đến các quy trình công nghiệp như sản xuất rượu và sản xuất ethanol sinh học (56). Phương pháp gây tiến hóa thích nghi cũng đã được sử dụng để nghiên cứu đáp ứng thích nghi với môi trường hạn chế nitơ (57, 58), và cụ thể hơn là cải biến khả năng sử dụng nitơ của nấm men (làm mất điều hòa NCR) để xử lý nước thải (59). Ngoài ra, phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên và chọn lọc một vòng đơn lẻ đã được sử dụng để phân lập các thể đột biến của nấm men trong phòng thí nghiệm có

ASP3 đã được giải ức chế để nghiên cứu các cơ chế của quá trình điều hòa *ASP3* được điều tiết bởi NCR (60).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng nhờ sử dụng phương pháp gây tiến hóa thích nghi lặp lại cụ thể, có thể phân lập được chủng nấm men mới có hoạt tính làm giảm asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng.

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập chủng nấm men mà phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) cấy chuyển chủng nấm men kiểu dại, mà biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện asparaginaza gắn thành tế bào, với sự có mặt của môi trường chứa nguồn nitơ duy nhất là D-asparagin;

b) cấy chuyển liên tục, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần;

c) chọn lọc các giống cây trong bước b) khi tốc độ sinh trưởng đạt đến đường cơ sở;

d) cấy chuyển liên tục các tế bào được chọn trong môi trường chọn lọc chứa metylamin, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần cho đến khi tốc độ sinh trưởng, với sự có mặt của metylamin, đạt đến tốc độ sinh trưởng trong môi trường chọn lọc không chứa metylamin;

e) phân lập các khuẩn lạc riêng lẻ trong bước d) bằng cách rĩa cây trên môi trường chọn lọc chứa metylamin, cho các khuẩn lạc này sinh trưởng và chọn lọc các khuẩn lạc lớn và sinh trưởng nhanh;

f) thử nghiệm các khuẩn lạc được chọn trong bước e) về khả năng phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng và chọn lọc ít nhất một khuẩn lạc có hoạt tính phân giải L-asparagin cao so với các tế bào tại thời điểm bắt đầu bước d);

g) lặp lại bước d) đến bước f) với các tế bào được chọn trong bước f), làm tăng nồng độ metylamin mỗi lần, cho đến khi hoạt tính phân giải L-asparagin đạt đến trạng thái ổn định;

h) phân lập chủng từ bước g) trong đó hoạt tính phân giải L-asparagin đã đạt đến trạng thái ổn định.

Theo một phương án, asparaginaza gắn thành tế bào được mã hóa bởi locus *ASP3*.

Theo một phương án, chủng nấm men kiểu đại là chủng men công nghiệp. Theo một phương án, chủng nấm men là chủng men bánh mỳ công nghiệp.

Các chủng nấm men có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chi và các loài thuộc giới nấm. Theo một phương án, các chi và các loài có thể được chọn từ các chi và các loài được sử dụng trong sản xuất thực phẩm. Theo phương án khác, các loài này là, nhưng không giới hạn ở, *Aspergillus acidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Candida etchellsii*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida versatilis*, *Candida zemplinina*, *Candida zeylanoides*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindnera mrakii*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Fusarium domesticum*, *Fusarium venenatum*, *Galactomyces candidum*, *Geotrichum candidum*, *Guehomyces pullulans*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Lecanicillium lecanii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium solitum*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis*, *Pichia pijperi*, *Rhizopus microspores*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces vanrijiae*, *Scopulariopsis flava*, *Starmerella bombicola*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis holmii*, *Trigonopsis cantarellii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygotorulaspora florentina*. Có nhiều nguồn thương mại cung cấp các chủng nấm men, như Lallemand Inc. (Canada), AB Mauri (Australia) và Lesaffre (Pháp).

Theo một phương án, phương pháp gây đột biến là gây đột biến vật lý, như gây đột biến bằng tia UV. Theo phương án khác, phương pháp gây đột biến là gây đột biến hóa học.

Theo một phương án, bước a) đến bước c) diễn ra trong 2 đến 4 tuần. Theo một phương án, bước d) đến bước g) diễn ra trong 6 đến 48 tuần.

Theo một phương án, số lần lặp lại trong bước g) là 5 đến 20.

Theo phương án khác, các khuẩn lạc được cho sinh trưởng trong 2 đến 10 ngày trong bước e) trước khi chọn lọc các khuẩn lạc lớn và sinh trưởng nhanh.

Theo một phương án, trong bước g), lượng metylamin được làm tăng lên từ từ, ví dụ, tăng lên 25-50% mỗi lần lặp lại. Theo một phương án, lượng metylamin trong bước e) là lượng đủ để ức chế tốc độ sinh trưởng 25-75% so với tốc độ sinh trưởng trong môi trường chọn lọc không chứa metylamin. Theo phương án khác, metylamin có thể được làm tăng từ 0,05 g/L đến 12 g/L trước khi hoạt tính phân giải L-asparagin đạt đến trạng thái ổn định.

Sáng chế cũng đề xuất nấm men được tạo ra bằng phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất nấm men không cải biến về mặt di truyền được phân lập biểu hiện asparaginaza gắn thành tế bào và có hoạt tính làm giảm asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng. Theo một phương án, nấm men không cải biến về mặt di truyền được phân lập làm giảm asparagin ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc cao hơn khi được cho sinh trưởng trong điều kiện không gây cảm ứng. Theo một phương án, asparaginaza gắn thành tế bào được biểu hiện một cách cơ định. Theo một phương án, asparaginaza gắn thành tế bào được mã hóa bởi locus *ASP3*. Theo một phương án, chủng nấm men là chủng men công nghiệp. Theo một phương án, chủng nấm men là chủng men bánh mỳ công nghiệp.

Sáng chế cũng đề xuất chủng nấm men được phân lập được nộp lưu tại Cơ quan nộp lưu quốc tế của Canada (IDAC: International Depositary Authority of Canada) với số truy cập là 140515-01 ("RBAR-01"), 140515-02 ("RBAR-02") và/hoặc 140515-03 ("RBAR-03").

Các tác giả sáng chế còn cho thấy rằng các chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này đặc biệt hữu dụng trong việc làm giảm asparagin, nhờ đó làm giảm sự

tạo thành acrylamit trong quá trình chuẩn bị và chế biến thực phẩm. Theo đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm asparagin, và theo đó là sự tạo thành acrylamit, trong quá trình chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm, bao gồm bước bổ sung chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm; trong đó nấm men này làm giảm asparagin, và theo đó là sự tạo thành acrylamit, trong quá trình chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm.

Theo một phương án, chủng nấm men là dạng bất hoạt. Theo phương án khác, nấm men là dạng tươi. Theo phương án khác, nấm men là nấm men khô dạng hoạt động.

Thực phẩm có thể là thực phẩm bất kỳ mà thường chứa asparagin và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thực phẩm làm từ rau củ, đồ uống, bánh nướng, sản phẩm hạt, trái cây, đậu đỗ, sản phẩm sữa hoặc sản phẩm thịt. Theo một phương án, thực phẩm là bánh nướng, như bánh mì, bánh quy hoặc bánh mì xoắn. Theo một phương án, thực phẩm là khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây. Theo phương án khác, thực phẩm là cà phê.

Theo một phương án, thực phẩm là khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây, và việc bổ sung nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước ngâm sơ bộ khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây trong hỗn hợp gồm nước và chủng nấm men trước khi nấu.

Theo phương án khác, thực phẩm là đồ ăn nhẹ làm từ khoai tây, và việc bổ sung nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước bổ sung nấm men vào hệ giống bột nhào làm từ khoai tây trước khi tạo thành, ép đùn hoặc theo cách khác tạo ra sản phẩm ép cần được nấu bằng cách nướng, rán hoặc rang.

Theo phương án khác, thực phẩm là cà phê, và việc bổ sung chủng nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước ngâm hạt cà phê xanh còn tươi trong chất chiết hạt cà phê xanh mà đã được xử lý sơ bộ bằng chủng nấm men để làm giảm asparagin, để chất chiết đã được xử lý sơ bộ này rút hết asparagin ra khỏi hạt cà phê trước khi rang.

Theo phương án khác nữa, thực phẩm là cà phê, và việc bổ sung chủng nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước lên men hạt cà phê xanh đã xay với chủng nấm men trước khi rang.

Sáng chế còn đề xuất thực phẩm có lượng asparagin giảm được tạo ra bằng cách sử dụng chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các dấu hiệu và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ được thấy rõ từ phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng phần mô tả chi tiết sáng chế và các ví dụ cụ thể mặc dù thể hiện các phương án của sáng chế nhưng chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa, vì các thay đổi và các cải biến khác thuộc phạm vi của sáng chế sẽ được thấy rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này từ phần mô tả chi tiết sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả kết hợp với các hình vẽ trong đó:

Fig.1 là sơ đồ thể hiện chiến lược tiến hóa thích nghi được sử dụng để tạo ra các chủng nấm men AR (làm giảm acrylamit) được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig.2 thể hiện các chủng nấm men AR phân giải L-asparagin ngay cả khi được cho sinh trưởng trong môi trường giàu. Chủng kiểu đại này, các chủng AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03), và chủng đối chứng GMO đã được thiết kế để biểu hiện quá mức *ASP3*, được cho sinh trưởng trong YEG qua đêm (18 giờ ở 30°C) trước khi cấy 2×10^7 tế bào trong 5 mL YEG mới có bổ sung 0,6 g/L L-asparagin. Các tế bào được ủ trong YEG + L-asparagin cho các thời điểm khác nhau trước khi bất hoạt bằng nhiệt ở 80°C. Nồng độ L-asparagin còn lại trong mỗi mẫu được đo bằng bộ kit thử nghiệm enzym đo màu. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.3 thể hiện chiến lược tiến hóa thích nghi lặp lại cần để tạo ra các chủng nấm men AR. Chủng kiểu đại này cũng như các chủng AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) được đặt trên đĩa trên môi trường không chọn lọc (YEG + D-asparagin), môi trường có độ chọn lọc vừa phải được sử dụng bởi Kamerud và Roon (YEG + D-asparagin + 3,1 g/L metylamin), và môi trường có độ chọn lọc cao được sử dụng trong nghiên cứu này (YEG + D-asparagin + 12 g/L metylamin). Lượng các tế bào bằng

nhau cho mỗi chủng được đặt vào trong các dãy pha loãng 10 lần. Các đĩa được ủ ở 30°C trong bốn ngày. Các dữ liệu là đại diện của ba thử nghiệm giống nhau.

Fig.4 thể hiện các chủng nấm men AR thu được theo cách tiến hóa từ bố mẹ kiểu dại của chúng. Việc tạo dấu ấn PCR intra-delta được sử dụng để so sánh các chủng nấm men AR thế hệ sau so với chủng bố mẹ kiểu dại của chúng. ADN hệ gen được chiết ra từ giống cấy qua đêm của mỗi chủng và được sử dụng làm khuôn mẫu cho inter-delta PCR như đã mô tả trước đó (61). Các amplicon được quan sát bằng mắt thường thông qua việc điện di gel agarosa. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.5 thể hiện các chủng nấm men AR phân giải theo cách cơ định L-asparagin và biểu hiện theo cách cơ định asparaginaza gắn thành tế bào II (ASP3). Các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03), cũng như bố mẹ kiểu dại của chúng, được lấy mẫu 6 giờ một lần trong quá trình sinh trưởng trong YEG. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần. A) Tốc độ sinh trưởng của mỗi chủng được phát hiện bằng phép đo OD₆₀₀. B) Hoạt tính phân giải L-asparagin của mỗi chủng được đo bằng thử nghiệm phân giải L-asparagin đã chuẩn hóa (thời gian ủ trong thử nghiệm là 1 giờ). C) Sự biểu hiện tương đối của *ASP3* ở mỗi chủng được đo trong ba bản sao kỹ thuật bằng qPCR của cADN được phiên mã ngược từ ARN tổng số đã tách chiết. Số lần thay đổi của *ASP3* được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta Ct$ và được chuẩn hóa dựa trên *ACT1* và *ASP3* kiểu dại. D) Sự biểu hiện tương đối của *ASP1* ở mỗi chủng được đo trong ba bản sao kỹ thuật bằng qPCR của cADN được phiên mã ngược từ ARN tổng số đã tách chiết. Giá trị về số lần thay đổi của *ASP1* được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta Ct$ và được chuẩn hóa dựa trên *ACT1* và kiểu dại *ASP1*.

Fig.6 thể hiện động học của quá trình phân giải L-asparagin khác nhau giữa các chủng nấm men AR. Chủng kiểu dại này, cũng như các chủng AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) được cho sinh trưởng trong YEG qua đêm (18 giờ ở 30°C) trước khi cấy 2×10^7 tế bào trong 5 mL YEG mới có bổ sung 0,6 g/L L-asparagin. Các tế bào được ủ trong YEG + L-asparagin cho các thời điểm khác nhau trước khi bất hoạt bằng nhiệt ở 80°C. Nồng độ L-asparagin còn lại trong mỗi mẫu được đo bằng bộ kit thử nghiệm enzym đo màu. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.7 thể hiện số lượng gen tối thiểu được biểu hiện về mặt tổng thể khác nhau ở các chủng nấm men AR. ARN tổng số được thu từ chủng kiểu đại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) trong quá trình sinh trưởng theo hàm mũ trong YEG. Thư viện đọc trình tự ARN (TruSeq v3)—được chuẩn bị từ ARN tổng số—được đọc trình tự trên nền tảng có chế độ cho hiệu suất cao Illumina HiSeq2500 với cấu hình đầu ghép cặp 2x100 bp. Dữ liệu đọc thô được lọc chất lượng và lập bản đồ đối với hệ gen tham chiếu S288C. Giá trị về số lần thay đổi $\log_2$ (so với kiểu đại) được thể hiện cho mỗi trong số 6.604 ORF của nấm men (được xác nhận, không phân tích đặc điểm và không rõ ràng). Đường chấm chấm được vẽ ở +1,5, 0, và -1,5 để tham chiếu. Đường mở nằm trong mỗi hàng là số lần thay đổi thực tế cho mỗi gen. Việc sắp xếp theo cách phân cấp được sử dụng để phân nhóm cả các cụm gen và các chủng.

Fig.8 thể hiện nhiều gen được biểu hiện khác nhau phổ biến đối với mọi chủng nấm men AR. ARN tổng số được thu từ chủng kiểu đại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) trong quá trình sinh trưởng theo hàm mũ trong YEG. Thư viện đọc trình tự ARN (TruSeq v3)—được chuẩn bị từ ARN tổng số—được đọc trình tự trên nền tảng có chế độ cho hiệu suất cao Illumina HiSeq2500 với cấu hình đầu ghép cặp 2x100 bp. Dữ liệu đọc thô được lọc chất lượng và lập bản đồ thành hệ gen tham chiếu S288C. A) Số lần thay đổi $\log_2$ (so với kiểu đại) được thể hiện cho mỗi trong số các gen được biểu hiện khác nhau ($\geq |1,5| \log_2$ lần thay đổi & $\geq$ số đếm 100 ở nấm men kiểu đại). Đường chấm chấm được vẽ ở +1,5, 0, và -1,5 để tham chiếu. Đường mở nằm trong mỗi hàng là số lần thay đổi thực tế cho mỗi gen. Việc sắp xếp theo cách phân cấp được sử dụng để phân nhóm cả các cụm gen và các chủng. B) Sơ đồ chồng lấp của Venn giữa các gen được biểu hiện khác nhau trong mỗi các chủng nấm men AR.

Fig.9 thể hiện nhiều gen NCR và các chất vận chuyển axit amin được biểu hiện khác nhau trong mỗi chủng nấm men AR. ARN tổng số được thu từ chủng kiểu đại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) trong quá trình sinh trưởng theo hàm mũ trong YEG. Thư viện đọc trình tự ARN (TruSeq v3)—được chuẩn bị từ ARN tổng số—được đọc trình tự trên nền tảng có chế độ cho hiệu suất cao Illumina HiSeq2500 với cấu hình đầu ghép cặp 2x100 bp. Dữ liệu đọc thô được lọc chất lượng và lập bản đồ thành hệ gen tham chiếu S288C. A) Số

lần thay đổi Log2 (so với kiểu dại) được thể hiện cho mỗi trong các gen NCR được chú giải (71). B) Số lần thay đổi Log2 (so với kiểu dại) được thể hiện cho mỗi trong số các chất vận chuyển axit amin được chú giải (71). A và B) Đường chấm chấm được vẽ ở +1,5, 0, và -1,5 để tham chiếu. Đường mở nằm trong mỗi hàng là số lần thay đổi thực tế cho mỗi gen. Việc sắp xếp theo cách phân cấp được sử dụng để phân nhóm các cụm gen và các chủng.

Fig.10 thể hiện phần lớn các đột biến được xác định ở các chủng nấm men AR mà phổ biến ở tất cả các chủng. ADN hệ gen được thu từ chủng kiểu dại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03). Thư viện đọc trình tự (Nextera XT)—được chuẩn bị từ ADN hệ gen—được đọc trình tự trên nền tảng Illumina MiSeq có cấu hình đầu ghép cặp 2x300 bp. Dữ liệu đọc thô được lọc chất lượng và lập bản đồ thành hệ gen tham chiếu S288C. Dữ liệu đọc được sử dụng để gọi các biến thể ở mỗi nucleotit tương ứng với trình tự liên ứng S288C. Các biến thể ở các chủng nấm men AR được lọc dựa trên các biến thể kiểu dại để loại bỏ các đột biến không cần thiết. Sơ đồ Venn của phần chồng lấp giữa các đột biến đã được lọc trong mỗi chủng nấm men AR.

Fig.11 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm lượng acrylamit trong bánh mì và bánh mì nướng. Bánh mì trắng và bánh mì làm hoàn toàn bằng bột mì (có bổ sung 0 hoặc 7% sucroza) được sản xuất từ nấm men kiểu dại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Mức AA được phân tích trong bánh mì chưa nướng, cũng như các mức nướng ở nhiệt độ thấp, trung bình và cao, như được xác định trong phần nguyên liệu và phương pháp. A) Bánh mì trắng chứa 0% sucroza. B) Bánh mì trắng chứa 7% sucroza. C) Bánh mì làm hoàn toàn từ bột mì chứa 0% sucroza. D) Bánh mì làm hoàn toàn từ bột mì chứa 7% sucroza. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.12 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm acrylamit trong khoai tây chiên. Khoai tây chiên từ các củ khoai tây tươi Russet được tạo ra bằng cách ngâm khoai tây cắt miếng, chưa nấu trong nước mà không bổ sung nấm men, bổ sung nấm men kiểu dại, hoặc bổ sung các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Mức AA được phân tích trong sản phẩm cuối cùng thu được sau khi rán. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.13 thể hiện rằng chủng nấm men AR, RBAR-03 làm giảm acrylamit trong khoai tây chiên theo cách phụ thuộc liều lượng trong các khoảng thời gian ủ ngắn và nhiệt độ cao. Các củ khoai tây cắt miếng được xử lý sơ bộ như được mô tả trong phần phương pháp và sau đó, được ủ trong 50 giây trong nước, hoặc nước cùng với 100, 200, 250, hoặc 300 g/L chủng nấm men AR dạng kem (hàm lượng các chất rắn là 23%) ở 68°C. Sau khi rán, các mức acrylamit trong khoai tây chiên được đo bằng UPLC/MS. Các dữ liệu là đại diện của ba thử nghiệm giống nhau.

Fig.14 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm acrylamit trong thực phẩm ăn nhẹ rán làm từ khoai tây. Sản phẩm ăn nhẹ làm từ khoai tây ép đùn và rán được tạo ra mà không bổ sung nấm men, bổ sung nấm men kiểu đại, hoặc bổ sung các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Các mức Asparagin được phân tích ở các thời điểm trong quy trình sản xuất (A) và mức AA được phân tích trong sản phẩm cuối cùng thu được sau khi rán (B). Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.15 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm acrylamit trong bánh quy ngọt. Bánh quy ngọt được sản xuất mà không bổ sung nấm men, bổ sung nấm men kiểu đại, hoặc bổ sung các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Mức AA được phân tích trong thành phẩm. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.16 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm acrylamit trong bánh mì xoắn. Bánh mì xoắn được sản xuất có bổ sung nấm men kiểu đại, hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Mức AA được phân tích trong sản phẩm cuối cùng. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Fig.17 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm acrylamit trong cà phê khi lên men trực tiếp các hạt cà phê xanh. Hạt cà phê xanh đã xay được ủ trong nước, nấm men kiểu đại, hoặc chủng AR RBAR-03. Sau khi ủ, các hạt cà phê đã xay được làm khô và rang, sau đó phân tích mức AA.

Fig.18 thể hiện các chủng nấm men AR làm giảm asparagin trong chất chiết cà phê xanh. Chất chiết cà phê xanh (hàm lượng chất rắn tan là 18%) được ủ với nấm men AR ở các nồng độ khác nhau. Sau khi ủ, các chất chiết này được làm trong bằng

cách ly tâm và mức L-Asparagin được phân tích. Các dữ liệu là giá trị đại diện của các thí nghiệm lặp lại hai lần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng quy trình gây đột biến ngẫu nhiên lặp lại kết hợp với áp lực chọn lọc được tạo ra để phát triển chủng nấm men công nghiệp có hoạt tính làm giảm asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng.

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập chủng nấm men mà phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) cấy chuyển chủng nấm men kiểu dại, mà biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện asparaginaza gắn thành tế bào, với sự có mặt của môi trường chứa nguồn nitơ duy nhất là D-asparagin;

b) cấy chuyển liên tục, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần;

c) chọn lọc các giống cây trong bước b) khi tốc độ sinh trưởng đạt đến đường cơ sở;

d) cấy chuyển liên tục các tế bào được chọn trong môi trường chọn lọc chứa metylamin, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần cho đến khi tốc độ sinh trưởng, với sự có mặt của metylamin, đạt đến tốc độ sinh trưởng trong môi trường chọn lọc không chứa metylamin;

e) phân lập các khuẩn lạc riêng lẻ trong bước d) bằng cách rĩa cây trên môi trường chọn lọc chứa metylamin, cho các khuẩn lạc này sinh trưởng và chọn lọc các khuẩn lạc lớn và sinh trưởng nhanh;

f) thử nghiệm các khuẩn lạc được chọn trong bước e) về khả năng phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng và chọn lọc ít nhất một khuẩn lạc có hoạt tính phân giải L-asparagin cao so với các tế bào tại thời điểm bắt đầu bước d);

g) lặp lại bước d) đến bước f) với các tế bào được chọn từ bước f), làm tăng nồng độ metylamin mỗi lần, cho đến khi hoạt tính phân giải L-asparagin đạt đến trạng thái ổn định;

h) phân lập chủng từ bước g) trong đó hoạt tính phân giải L-asparagin đã đạt đến trạng thái ổn định.

Theo một phương án, asparaginaza gắn thành tế bào được mã hóa bởi locus ASP3 (Số truy cập ngân hàng gen NM_001182042.1).

Theo một phương án, chủng nấm men kiểu đại là chủng men công nghiệp. Theo một phương án, chủng nấm men là men bánh mỳ (*S. cerevisiae*).

Thuật ngữ “nấm men công nghiệp” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chủng được sử dụng trong các quy trình công nghiệp, trái với nấm men trong phòng thí nghiệm được sử dụng chủ yếu để nghiên cứu trong phòng thí nghiệm. Cụ thể là, nấm men công nghiệp có xu hướng chủ yếu là thể lưỡng bội, với một số có thể là thể tam bội, thể tứ bội, hoặc thể lệch bội lẻ. Tương tự, nấm men trong phòng thí nghiệm có xu hướng là thể đơn bội.

Các chủng nấm men có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chi và các loài thuộc giới nấm. Theo một phương án, các chi và các loài được chọn từ các chi và các loài được sử dụng trong sản xuất thực phẩm. Theo phương án khác, các loài này là, nhưng không giới hạn ở, *Aspergillus acidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Candida etchellsii*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida versatilis*, *Candida zemplinina*, *Candida zeylanoides*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindnera mrakii*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Fusarium domesticum*, *Fusarium venenatum*, *Galactomyces candidum*, *Geotrichum candidum*, *Guehomyces pullulans*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Lecanicillium lecanii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium solitum*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis*, *Pichia pijperi*, *Rhizopus microspores*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*

pombe, *Schwanniomyces vanrijiae*, *Scopulariopsis flava*, *Starmerella bombicola*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis holmii*, *Trigonopsis cantarellii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygotorulaspora florentina*. Có nhiều nguồn thương mại cung cấp các chủng nấm men, như Lallemand Inc. (Canada), AB Mauri (Australia) và Lesaffre (Pháp).

Theo một phương án, việc gây đột biến xảy ra bằng cách gây đột biến vật lý, bao gồm, nhưng không giới hạn ở UV, và các dạng gây đột biến dựa trên việc chiếu xạ như gây đột biến bằng tia X và tia gama. Theo một phương án, gây đột biến vật lý là gây đột biến bằng tia UV. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ các điều kiện để gây đột biến bằng UV. Đối với việc gây đột biến bằng tia UV, các tế bào có thể được tiếp xúc với nguồn ánh sáng UV (cường độ hằng số tiêu chuẩn) trong các khoảng thời gian khác nhau. Liều lượng có thể dựa trên tỉ lệ chết — tính trung bình trong mỗi lần xử lý, các giống cây có thể được tiếp xúc với ánh sáng UV đủ để tiêu diệt từ 25% đến 90% lượng tế bào.

Theo phương án khác, sự gây đột biến xảy ra bằng cách gây đột biến hóa học (ví dụ, EMS – etyl metansulfonat).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng việc gây đột biến được sử dụng để tăng tỷ lệ đột biến và do đó, tăng khả năng phát hiện ra các đột biến quan tâm trong các điều kiện chọn lọc thích hợp.

Thuật ngữ “điều kiện không gây cảm ứng” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các điều kiện nuôi cấy bất kỳ, mà trong điều kiện này, việc phân giải L-asparagin ngoại bào thường được ngăn không cho xảy ra trong nấm men kiểu dại. Ngược lại, “các điều kiện chọn lọc” chỉ các điều kiện nuôi cấy mà D-asparagin là nguồn nitơ duy nhất và đối với áp lực chọn lọc tăng, có thể có mặt chất ức chế sinh trưởng như metylamin.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ các điều kiện nuôi cấy tế bào nấm men. Ví dụ, đối với (a), tế bào nấm men có thể được sinh trưởng ở nhiệt độ 30°C trong môi trường lỏng chọn lọc, như môi trường gồm bazơ nitơ nấm men không có axit amin hoặc amoni sulfat (YNB-AA/AS) có bổ sung nguồn cacbon, như sucroza 2% (trọng lượng/ thể tích), và D-asparagin, như 10 g/L nhưng nồng độ có thể thay đổi từ 0,5 đến 15 g/L phụ thuộc chủng. Các giống cây qua đêm có

thể được cấy chuyển hằng ngày vào môi trường mới tại nồng độ thích hợp, ví dụ, mật độ quang học (OD_{600}) là 0,01.

Đối với (d) việc chọn lọc bằng metylamin, tế bào có thể được sinh trưởng ở nhiệt độ 30°C trong môi trường lỏng chọn lọc, như môi trường bao gồm bazơ nitơ nấm men không có axit amin hoặc amoni sulfat (YNB-AA/AS) có bổ sung nguồn cacbon, như sucroza 2% (trọng lượng/ thể tích), và D-asparagin, như 10 g/L nhưng nồng độ có thể thay đổi từ 0,5 đến 15 g/L phụ thuộc các chủng, và ngoài ra, có bổ sung lượng metylamin khác nhau.

Đối với (e) việc phân lập khuẩn lạc riêng rẽ được chọn bằng metylamin, tế bào có thể được dàn mỏng và được sinh trưởng ở nhiệt độ 30°C trên môi trường lỏng chọn lọc, như môi trường gồm bazơ nitơ nấm men mà không có axit amin hoặc amoni sulfat (YNB-AA/AS) có bổ sung nguồn cacbon, như sucroza 2% (trọng lượng/ thể tích), D-asparagin, như 10 g/L nhưng nồng độ có thể thay đổi từ 0,5 đến 15 g/L phụ thuộc các chủng, và lượng thạch đủ để làm rắn môi trường, và ngoài ra có bổ sung lượng metylamin khác nhau.

Để duy trì chung cho nấm men, tế bào có thể được sinh trưởng ở nhiệt độ 30°C trên môi trường lỏng không chọn lọc, như môi trường thạch YEG (2% chất chiết nấm men + 1% glucoza + 2% thạch).

Phương pháp để xác định tốc độ sinh trưởng đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các ví dụ về các phép đo này được mô tả ở đây trong các ví dụ. Theo một phương án, tốc độ sinh trưởng được xác định bằng cách đo mật độ quang học. Mật độ quang học là phương pháp được sử dụng nhanh nhất và rộng rãi nhất và dựa trên thực tế là nấm men tán xạ ánh sáng trong huyền phù nước. Lượng ánh sáng tán xạ tỷ lệ thuận với số lượng của tế bào cho mỗi đơn vị thể tích, nghĩa là, nồng độ tế bào. Theo một phương án, tốc độ sinh trưởng được xác định bằng cách đếm số lượng tế bào. Số lượng tế bào trong thể tích của môi trường nuôi cấy có thể được đếm một cách chính xác bằng cách sử dụng kính hiển vi và huyết cầu kế. Theo phương án khác, tốc độ sinh trưởng trên môi trường rắn có thể được xác định bằng cách so sánh về thị giác kích thước khuẩn lạc giữa các tế bào sinh trưởng theo cách tương đồng (nghĩa là cùng thời gian, nhiệt độ, và môi trường). Ví dụ, khuẩn lạc lớn hơn được sinh trưởng nhanh hơn khuẩn lạc nhỏ hơn.

Cụm từ “các khuẩn lạc lớn và sinh trưởng nhanh” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các khuẩn lạc có sự xuất hiện trực quan nhanh nhất và kích thước khuẩn lạc rộng nhất so với kích thước trung bình xấp xỉ của khuẩn lạc trên đĩa. Việc định danh này có thể là việc định tính trong tự nhiên và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có khả năng xác định các khuẩn lạc đáp ứng các tiêu chuẩn này.

Thuật ngữ “đường cơ sở” có liên quan đến tốc độ sinh trưởng như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ tốc độ sinh trưởng của chủng trên môi trường không gây cảm ứng và môi trường không chọn lọc (môi trường chứa nguồn nitơ tốt, nghĩa là môi trường giàu dinh dưỡng, nghĩa là không chỉ D-asparagin và/hoặc chứa metylamin).

Theo một phương án, trong bước g), lượng metylamin được làm tăng lên từ từ, ví dụ, tăng lên 25-50% mỗi lần lặp lại sao cho lượng tăng ban đầu nhỏ và lượng tăng sau lớn hơn. Theo một phương án, lượng metylamin trong bước e) là lượng đủ để ức chế tốc độ sinh trưởng 25-75% so với tốc độ sinh trưởng trong môi trường chọn lọc không chứa metylamin. Theo phương án khác, metylamin có thể được làm tăng từ 0,05 g/L đến 12 g/L trước khi hoạt tính phân giải L-asparagin đạt đến trạng thái ổn định.

Khung thời gian đối với việc cấy chuyển và tổng số lần lặp lại có tính tiến hóa thay đổi và phụ thuộc vào số lượng biến số bao gồm sự phức tạp về mặt di truyền của chủng kiểu đại, dạng gây đột biến được sử dụng (nghĩa là hóa chất, UV, tia X), liều gây đột biến, và tính khắt khe khi chọn lọc. Theo một phương án, bước a) đến bước c) diễn ra trong 2 tuần đến 4 tuần. Theo một phương án, bước d) đến bước g) diễn ra trong 6 tuần đến 48 tuần. Theo một phương án, số lần lặp lại trong bước g) là 5 đến 20.

Các khuẩn lạc có thể được thử nghiệm về khả năng phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng như được mô tả, trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, chẳng hạn.

Sáng chế cũng đề xuất nấm men được tạo ra bằng phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất nấm men không được cải biến về mặt di truyền đã được phân lập biểu hiện asparaginaza gắn thành tế bào và có hoạt tính làm giảm asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng. Theo một phương án, nấm

men không được cải biến về mặt di truyền đã được phân lập làm giảm asparagin đi ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc cao hơn khi sinh trưởng trong điều kiện không gây cảm ứng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thử nghiệm khả năng làm giảm asparagin của chủng nấm men bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một phương án, asparaginaza gắn thành tế bào được mã hóa bởi locus ASP3.

Theo một phương án, nấm men không được cải biến về mặt di truyền đã được phân lập biểu hiện một cách cơ định asparaginaza thành tế bào. Biểu hiện một cách cơ định như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ sự biểu hiện gen liên tục thông qua sự sinh trưởng của vi sinh vật, thay vì biểu hiện chọn lọc phụ thuộc vào các điều kiện sinh trưởng. Theo một phương án, chủng nấm men là chủng men công nghiệp. Theo một phương án, chủng nấm men là chủng men bánh mỳ công nghiệp.

Sáng chế cũng đề xuất chủng nấm men đã được phân lập được nộp lưu vào ngày 14 tháng 5 năm 2015 với Cơ quan nộp lưu quốc tế của Canada (IDAC), Phòng thí nghiệm vi sinh học Quốc gia (National Microbiology Laboratory), Cơ quan y tế công cộng Canada (Public Health Agency of Canada), 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E 3R2 với số truy cập là 140515-01 (ở đây được gọi là “RBAR-01”), 140515-02 (ở đây được gọi là “RBAR-02”) và/hoặc 140515-03 (ở đây được gọi là “RBAR-03”). Số nộp lưu và giấy xác nhận khả năng sống của các chủng này được nêu trong phụ lục A.

Các tác giả sáng chế còn cho thấy rằng các chủng nấm men tiến hóa này đặc biệt hữu dụng trong việc làm giảm asparagin, và theo đó là làm giảm acrylamit trong quá trình chế biến và chuẩn bị thực phẩm và do đó, chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này được gọi là nấm men làm giảm acrylamit hoặc nấm men AR. Thuật ngữ “nấm men làm giảm acrylamit” và “nấm men làm giảm asparagin” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Theo đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm asparagin, và theo đó là làm giảm acrylamit trong quá trình chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm, bao gồm bước bổ sung chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm; trong đó nấm men này làm giảm asparagin, và theo đó là làm giảm sự tạo thành acrylamit trong quá trình chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm.

Theo một phương án, chủng nấm men là dạng bất hoạt. Thuật ngữ “bất hoạt” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chế phẩm của sinh vật nấm men chết và/hoặc sống, bất hoạt vẫn giữ được hàm lượng dinh dưỡng và các đặc tính khác của chúng. Ví dụ, nấm men có thể được sinh trưởng trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện quá mức của protein hoặc các protein mong muốn. Sau đó, nấm men có thể được sử dụng để tạo ra nấm men bất hoạt, ví dụ, thông qua nhiều phương pháp khử trùng Pasteur bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp Pasteur nhiệt độ cao và thời gian ngắn, nhiều phương pháp khử trùng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiệt ẩm và chiếu xạ, nhiều phương pháp bất hoạt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, áp suất cao, quang xúc tác và ánh sáng có xung, nhạy quang, điện trường bao gồm RF và xung, làm đứt gãy tế bào, nghiền bằng sóng siêu âm, đồng nhất hóa, tự phân giải, và bất hoạt bởi hóa chất bao gồm, nhưng không giới hạn ở, formaldehyt, thimerosol, cloramin, clo dioxit, iot, bạc, đồng, thuốc kháng sinh, và ozon.

Theo phương án khác, chủng nấm men là dạng tươi. Theo phương án khác nữa, chủng nấm men là nấm men khô dạng hoạt động. Nấm men tươi dùng để chỉ nấm men được cho sinh trưởng trong môi trường nấm men không chọn lọc (ví dụ như được định nghĩa ở trên) và được ly tâm để loại bỏ phần lớn chất lỏng. Nấm men tươi là dạng sống và có hoạt tính chuyển hóa. Nấm men tươi không phải là dạng ổn định bảo quản và thường chỉ tồn tại 1-5 tuần trong điều kiện giữ lạnh. Nấm men tươi điển hình có hàm lượng phần rắn khoảng 25%. Nấm men khô dạng hoạt động (ADY) là một sản phẩm đã được xử lý trong đó nấm men được sấy khô đến hàm lượng hơi ẩm cuối cùng là 3% (97% chất rắn). Tế bào nấm men trong sản phẩm này sống nhưng tro về mặt chuyển hóa cho đến khi tái hydrat hóa. Khi bịt kín chân không, ADY thường ổn định bảo quản trong thời gian từ 2 đến 4 năm. Phương pháp được chuẩn hóa để tạo ra ADY đã được biết rõ trong ngành công nghiệp nấm men như sản xuất rượu vang, nấu bia, và nướng bánh.

Cụm từ “làm giảm asparagin” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc làm giảm mức của asparagin hoặc làm giảm asparagin trong thực phẩm, chẳng hạn, ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% hoặc cao hơn so với chủng nấm men đối chứng, như chủng bố mẹ từ đó chủng nấm men được phát triển.

Asparagin là tiền chất giới hạn trong phản ứng mà tạo ra acrylamit trong quá trình chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm. Theo đó, theo phương án khác, sáng chế đề

xuất phương pháp làm giảm acrylamit trong thực phẩm bao gồm bước bổ sung chủng nấm men như được mô tả trong bản mô tả này vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm; trong đó nấm men này làm giảm asparagin do đó làm giảm acrylamit trong thực phẩm. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này để làm giảm nồng độ acrylamit trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm.

Cụm từ “làm giảm acrylamit” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc làm giảm mức độ của acrylamit trong thực phẩm ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% hoặc cao hơn so với khi vắng mặt chủng nấm men.

Theo một phương án, điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước lên men. Ví dụ, các phương pháp và cách sử dụng trong bản mô tả này là hữu ích trong bước lên men thực phẩm, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hydrat cacbon trong quá trình làm bánh mỳ, chế biến khoai tây, sản xuất bánh quy, sản xuất cà phê, hoặc sản xuất thực phẩm ăn nhẹ. Thuật ngữ “lên men” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ sự tiêu thụ đường và các chất dinh dưỡng khác bởi nấm men.

Theo đó, thực phẩm có thể là thực phẩm bất kỳ mà thường chứa asparagin và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thực phẩm làm từ rau củ, đồ uống, bánh nướng, sản phẩm hạt, trái cây, đậu đỗ, sản phẩm sữa hoặc thịt. Theo một phương án, thực phẩm là khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây. Theo phương án khác, thực phẩm là cà phê.

Theo một phương án, thực phẩm là khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây, và việc bổ sung nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước ngâm sơ bộ khoai tây hoặc thực phẩm làm từ khoai tây trong hỗn hợp gồm nước và chủng nấm men trước khi nấu. Theo một phương án, khoai tây được ngâm sơ bộ ở nhiệt độ trong phòng và được phơi ngoài trời trước khi nấu. Thuật ngữ “nấu” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rán, quay và nướng. Nồng độ của chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này trong hỗn hợp nước/chủng nấm men, theo một phương án, là ít nhất 1, ít nhất 10, ít nhất 50, ít nhất 100 g / L (trọng lượng tế bào khô / thể tích), hoặc cao hơn. Thời gian của bước trước khi ngâm, theo một phương án, là ít nhất 0,25 phút, ít nhất 0,5 phút, ít nhất 1 phút, ít nhất 5 phút, ít nhất 10 phút, ít nhất 20 phút, hoặc lâu hơn.

Theo phương án khác, thực phẩm là thực phẩm ăn nhẹ làm từ khoai tây, và việc bổ sung nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước bổ sung nấm men vào hệ giống như bột nhào làm từ khoai tây trước khi tạo thành, ép đùn, hoặc theo cách khác tạo ra sản phẩm ép cần được nấu bằng cách nướng, rán hoặc quay.

Theo phương án khác, thực phẩm là cà phê, và việc bổ sung chủng nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm việc ngâm hạt cà phê xanh trong chất chiết hạt cà phê xanh mà đã được xử lý sơ bộ bằng chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này để làm giảm asparagin, để chất chiết đã được xử lý sơ bộ này rút hết asparagin ra khỏi hạt cà phê trước khi rang. Theo một phương án, chất chiết được xử lý sơ bộ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, tùy chọn ở nhiệt độ 70°C. Thời gian của việc xử lý sơ bộ chất chiết, theo một phương án, là ít nhất 1 giờ, ít nhất 5 giờ, ít nhất 10 giờ, ít nhất 15 giờ, hoặc cao hơn.

Theo phương án khác nữa, thực phẩm là cà phê, và việc bổ sung chủng nấm men vào thực phẩm trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm bao gồm bước lên men hạt cà phê xanh đã xay với chủng nấm men trước khi rang.

Sáng chế còn đề xuất thực phẩm có lượng asparagin giảm và, theo đó acrylamit giảm, được tạo ra bằng cách sử dụng chủng nấm men được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thực phẩm có thể là thực phẩm bất kỳ được sản xuất trong điều kiện chế biến hoặc chuẩn bị thực phẩm dẫn đến sự chuyển hóa asparagin thành acrylamit. Điều kiện chế biến và chuẩn bị điển hình dẫn đến việc tạo thành acrylamit bao gồm bước chuẩn bị liên quan đến nhiệt độ nấu cao (lớn hơn 120°C) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rán và nướng, nướng hở, rang, nướng bằng vỉ, om và nướng trực tiếp trên lửa. Acrylamit thường thấy ở nồng độ cao trong sản phẩm khoai tây, bánh nướng và ngũ cốc hoặc sản phẩm hạt bất kỳ. Theo đó, theo một phương án, thực phẩm là rau, như khoai tây, khoai sọ, hoặc sản phẩm oliu, bánh nướng hoặc ngũ cốc hoặc sản phẩm hạt. Sản phẩm khoai tây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khoai tây chiên, khoai tây lát mỏng, đồ ăn nhẹ làm từ khoai tây được rán/ nướng và sản phẩm khoai tây được tạo hình. Bánh nướng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bánh quy, bánh quy dạng tròn, bánh quy giòn, bánh mỳ, sản phẩm bánh mỳ không cho bột nở vào, sản phẩm được

nhào bột, ngô và bánh bột ngô, bánh nướng, vỏ bánh, bánh ngọt và bánh nướng xốp, và bột nhào. Ví dụ, bánh mỳ có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bột nhào và bánh mỳ đông lạnh và tươi, bột nhào chua, bột nhào bánh pizza, bánh bao nhân nho và bánh cuộn và nhiều loại bánh mỳ, cũng như sản phẩm bánh mỳ có liên quan như thực phẩm ăn nhẹ được rán hoặc nướng hoặc ruốt bánh mỳ; và bánh nướng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bánh bao nhân nho ngọt, bánh rán, và bánh ngọt. Ngũ cốc hoặc sản phẩm hạt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngũ cốc ăn sáng điển hình, mạch nha và sản phẩm nước sữa, ngô lát mỏng và bánh mỳ xoắn. Thực phẩm khác được xử lý ở nhiệt độ cao, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cà phê, hạt rang, măng tây nướng, bia, mạch nha và đồ uống sữa nước, bột sôcôla, sản phẩm cá, sản phẩm thịt lợn và thịt gia cầm, súp hành và sốt nhúng (dip mix), bơ từ các hạt, đậu phụng được bọc, đậu tương rang, hạt hướng dương rang, thực phẩm rán hoặc nướng như viên bột đậu rán và kobbek, và thanh sôcôla.

Phần bộc lộ trên đây mô tả chung về sáng chế này. Sáng chế có thể hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ cụ thể dưới đây. Các ví dụ này được mô tả chỉ với mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi về dạng thức và sự thay thế của các dạng tương đương cũng nằm trong phạm vi của sáng chế khi điều kiện cho phép. Mặc dù thuật ngữ cụ thể được dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ này có ý nghĩa mô tả và không nhằm mục đích giới hạn.

Các ví dụ không giới hạn dưới đây minh họa sáng chế:

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Các chủng nấm men và môi trường

Các chủng nấm men được giữ trên các đĩa thạch (2% trọng lượng/thể tích glucoza, 1% trọng lượng/thể tích chất chiết nấm men, 2% trọng lượng/thể tích thạch). Các giống cấy qua đêm được phát triển từ các khuẩn lạc đơn lẻ đã được cấy vào môi trường YEG lỏng và được ủ trong 18 giờ ở nhiệt độ 30°C (250 vòng/phút).

Thử nghiệm phân cắt Asparagin

Mật độ tế bào của các giống cấy qua đêm được đo bằng bộ đếm huyết cầu. Sau đó, 1×10^7 tế bào được cấy vào 5 mL môi trường YEG có bổ sung 0,6 g/L L-asparagin

và được ủ ở 30°C. Ở các thời điểm được mô tả trong mỗi thử nghiệm, 500 µL môi trường được lấy ra, ly tâm ở 13.000 x g trong 1 phút (nhiệt độ phòng), và dịch nổi được chuyển vào ống mới. Hoạt tính của asparaginaza được bất hoạt bằng cách ủ dịch nổi này ở 80°C trong 30 phút. Lượng L-asparagin dư trong dịch nổi này được đo bằng thử nghiệm enzym theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Megazyme, K-ASNAM).

Tạo dấu ấn intra-delta

Việc tạo dấu ấn intra-delta được thực hiện như đã mô tả (61). Tóm tắt như sau: ADN hệ gen được chiết ra từ các giống cây qua đêm sử dụng phương pháp phenol-clorofom như đã mô tả trước đó (62). Các phản ứng *Taq* polymeraza PCR được kết hợp như sau: 100 ng ADN hệ gen, 1 µM đoạn mồi 1 (delta12: 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') (SEQ ID NO:1), 1 µM đoạn mồi 2 (delta21: 5'-CATCTTAACACCGTATATGA) (SEQ ID NO:2), 200 nM dNTP mix, 2,5 mM MgCl₂, 1x đệm *Taq* + KCl và 1 U *Taq* polymeraza (Thermo Fisher, EP0402). Việc khuếch đại được tiến hành trên máy chu trình nhiệt BioRad C1000 theo quy trình sau: 4:00 ở 95°C (biến tính ban đầu), 0:30 ở 95°C, 0:30 ở 46°C, 1:30 ở 72°C (35 chu trình), 10:00 ở 72°C (kéo dài lần cuối). Các sản phẩm PCR được chạy trên gel agarosa HRB 2% trọng lượng/thể tích (Amresco, E776) với đệm TBE tiêu chuẩn ở 8 V/cm, và được chụp hình bằng thuốc nhuộm axit nucleic GelGreen (Biotium).

Chiết ARN

5 đơn vị tế bào OD₆₀₀ được phân lập bằng cách ly tâm (13.000 x g, 1 phút, RT) và sau đó, đông lạnh nhanh trong đá khô/metanol. ARN tổng số được chiết bằng cách sử dụng phenol nóng có tính axit như đã mô tả trước đó (63). Tóm tắt như sau: các tế bào được rửa một lần bằng nước DEPC và sau đó được làm tan trong đệm TES và phenol-clorofom có tính axit trong 1 giờ ở 65°C. Pha lỏng được tinh chế bằng các ống gel khóa pha (5Prime) và phenol-clorofom có tính axit sau đó bằng ống gel khóa pha khác và clorofom : rượu isoamylic. ARN được kết tủa bằng etanol qua đêm ở -80°C, rửa bằng etanol 70%, và tái tạo huyền phù trong nước DEPC.

PCR định lượng (qPCR)

100 µg ARN tổng số thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột quay ARN tổng số EZNA (Omega Biotek) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ARN sau khi tinh chế

được định lượng và kiểm tra chất lượng bằng phân tích trên dải sàng lọc ARN (Agilent Technologies).

800 ng ARN tổng số sạch được biến đổi thành cADN bằng cách phiên mã ngược theo hướng dẫn của nhà sản xuất (BioRad, iScript Reverse Transcription kit). Việc định lượng mức biểu hiện tương đối của ASP1 và ASP3 được thực hiện trong ba bản sao. Các phản ứng iTaq Universal SYBR Green qPCR được sắp xếp như sau: 8 ng cADN, 500 nM đoạn mỗi xuôi, 500 nM đoạn mỗi ngược và 1x iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Việc khuếch đại được thực hiện trên máy chu trình nhiệt PCR định lượng StepOnePlus (Applied Biosystems) theo quy trình sau: 0:30 ở 95°C (biến tính ban đầu), 0:15 ở 95°C, 1:00 ở 60°C (40 chu trình), 65-95°C với mức bước tăng 0,5°C (đường cong nóng chảy). Phép phân tích số liệu định lượng được thực hiện bằng phương pháp $\Delta\Delta C_t$, chuẩn hóa theo gen giữ nhà ACT1.

Các đoạn mỗi cho qPCR là như sau:

ASP3_qPCR_Fwd 5'-GAGCGGATGAACAGGGATATT-3' (SEQ ID NO:3)
 ASP3_qPCR_Rev 5'-GGGTCTGTGAGGTTGGAAAT-3' (SEQ ID NO: 4)
 5'-CAAACCTGAGAGTGGACGGTAAG-3' (SEQ ID NO:5)
 ASP1_qPCR_Fwd 5'-GTTGACTATAGCTGGCGGAAA-3' (SEQ ID NO:6)
 ASP1_qPCR_Rev 5'-CGTCTGGATTGGTGGTTCTATC-3' (SEQ ID NO:7)
 ACT1_qPCR_Fwd 5'-GGACCACTTTCGTCGTATTCTT-3' (SEQ ID NO:8)
 ACT1_qPCR_Rev

Đọc trình tự ADN

ADN hệ gen được chiết từ canh trường nuôi cấy qua đêm sử dụng phương pháp phenol-clorofom như đã mô tả trước đó (62). Việc chuẩn bị thư viện Nextera XT được thực hiện theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Illumina). Việc đọc trình tự được thực hiện trên nền tảng Illumina MiSeq có cấu hình đầu ghép cặp 2x300 bp (GeneWiz).

Đọc trình tự ARN

ARN tổng số được chiết, làm sạch, và kiểm soát chất lượng như được mô tả ở trên. Việc chuẩn bị thư viện TruSeq v3 được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Illumina). Việc đọc trình tự được thực hiện trên nền tảng có chế độ cho hiệu suất cao Illumina HiSeq2500 với cấu hình đầu ghép cặp 2x100 bp (GeneWiz).

Sản xuất bánh mỳ

Nấm men dùng để sản xuất bánh mì được chuẩn bị bằng cách cấy vòng nuôi cấy từ đĩa YEG vào trong 75 mL môi trường YEG lỏng. Các chủng nuôi cấy này được sinh trưởng trong 18 giờ (30°C) và sau đó, định tỷ lệ chuyển vào trong 3 x 450 mL môi trường YEG và sinh trưởng trong 24 giờ như trước. Chủng nấm men nuôi cấy này được thu hoạch bằng cách ly tâm (10 phút, 4000 x g, RT). Nấm men dạng kem được rửa hai lần bằng cách tái tạo huyền phù trong nước đã khử trùng và ly tâm (10 phút, 4000 x g, RT).

Nấm men được hoạt hóa bằng cách lên men sơ bộ trong 45 phút ở 29°C (bảng 1), sau đó các thành phần còn lại được bổ sung vào nấm men đã lên men sơ bộ này và trộn trong 21 phút sử dụng máy khuấy tĩnh (KitchenAid) có lắp cánh khuấy có dạng như đầu đánh trứng (bảng 2). Bột nhào này được ủ trong 15 phút ở 22°C ("nhiệt độ sàn"), và được chia thành hai ổ bánh bằng nhau, và sau đó ủ trong 1,5 giờ ở 35°C (hoặc cho đến khi ổ này có kích thước gấp hai). Sau đó, các ổ đã chia được nướng trong 15 phút ở 204°C.

Bảng 1 | Hỗn hợp lên men sơ bộ để sản xuất bánh mì.

Thành phần	% bột (trọng lượng/trọng lượng)
Nước	25
Nấm men	4,7
Chất chiết nấm men	0,5
CaCO ₃	0,1
Đường sucroza	1
Muối (NaCl)	0,5

Bảng 2 | Hỗn hợp cuối cùng của các thành phần để sản xuất bánh mì.

Thành phần	Bánh mì trắng	Bánh mì làm hoàn toàn từ bột mì
Bánh nấm men	4,67	4,67
Nước (38°C)	58,33	58,33
Bột mì trắng	100	50
Bánh mì làm hoàn toàn từ bột mì	--	50
Đường sucroza	0,7	0,7
Dầu thực vật	4	4
Muối (NaCl)	2,17	2,17

* Các lượng được liệt kê dưới dạng % bột mì (khối lượng/khối lượng)

Sau khi nướng, các ổ bánh mỳ được làm nguội xuống RT và cắt thành các lát có kích thước 1,4 cm. Các mẫu bánh mỳ được nướng bằng cách sử dụng thiết bị nướng tiêu chuẩn dùng cho nhà bếp được lắp nhiệt kế số (VWR Traceable). Mức độ nướng được xác định bằng nhiệt độ của thiết bị nướng như sau: nhẹ – 167°C; trung bình – 217°C; cao – 235°C. Sau đó, các mẫu bánh mỳ và các mẫu đã nướng được nghiền (máy nghiền phân tích IKA, loại A11BS1) và được làm đồng nhất.

Sản xuất khoai tây chiên

Nấm men để sản xuất khoai tây chiên được chuẩn bị như đã mô tả trước đó cho bánh mỳ.

Khoai tây Russet được nạo vỏ, rửa, cắt miếng và chần trong nước 90°C trong 10 phút để bất hoạt các enzym gây thâm đen. Khoai tây đã trần được để ráo nước, làm nguội xuống RT, và bổ sung vào nước, hoặc hỗn hợp của nấm men AR và nước (bảng 3). Khoai tây được ủ trong hỗn hợp nước/nấm men ở RT, và các mẫu được lấy ở 10, 20, 40 và 60 phút, sau đó các mẫu ngay lập tức được làm khô trong không khí ở 80°C trong 10 phút. Sau đó, các mẫu khoai tây đã khô được nấu trong dầu ngô ở 175°C (bảng 3).

Để kiểm tra hiệu quả của nấm men AR trong điều kiện xử lý trong thời gian ngắn và ở nhiệt độ cao, 50 g khoai tây được ủ trong 50 giây trong 100 mL nước, hoặc 100 mL nước cùng với 100, 200, 250, hoặc 300 g/L nấm men AR dạng kem (hàm lượng chất rắn 23%) ở 68°C. Trước khi bổ sung vào khoai tây, hỗn hợp nấm men/nước được cân bằng đến 68°C trong 10 phút. Sau khi xử lý, các mẫu ngay lập tức được làm khô trong không khí ở 80°C trong 10 phút. Sau đó, các mẫu khoai tây đã sấy khô được nấu trong dầu ngô trong thiết bị chiên gián đoạn ở 175°C trong 5 phút. Việc chiên khoai và xử lý nấm men AR được thực hiện trong ba bản sao. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng kiểm định t-student, so với đối chứng sử dụng 0 g/L nấm men AR.

Bảng 3 | Hỗn hợp nấm men và các thông số nấu để xử lý khoai tây.

	g/L nước		Nhiệt độ nấu (°C)	Thời gian nấu (phút)	Độ dày (mm)
	Khoai tây	Nấm men			
Khoai tây rán	200	100	175	5	10 x 10

Sản xuất đồ ăn nhẹ dạng viên

Nấm men dùng để sản xuất đồ ăn nhẹ dạng viên được chuẩn bị như đã mô tả trước đó cho bánh mỳ.

Các thành phần dạng miếng vụn dùng để ăn nhẹ được bổ sung vào máy trộn để bàn (KitchenAid) được lắp bộ phận gắn cánh khuấy dẹt và trộn trong 5 phút theo (bảng 4). Các miếng vụn này được ép đùn thành dạng viên (có chiều dài khoảng 2 cm) sử dụng khuôn có đường kính 4 mm. Các viên thu được được sấy khô trong một lớp ở 60°C trong 3-3,5 giờ đến hàm lượng ẩm mong muốn 11%. Các viên được bảo quản trong 1 tuần trong túi nhựa kín khí sau đó chiên kỹ trong 10 giây ở 185°C.

Bảng 4 | Hỗn hợp thành phần cuối cùng để sản xuất đồ ăn nhẹ dạng viên

	% của tổng khối lượng các thành phần
Khoai tây dạng hạt	51,05
Khoai tây dạng miếng	6,63
Tinh bột khoai tây	6,63
Muối	1,66
Maltodextrin	0,33
Nước (hàm lượng ẩm mong muốn 38%)	29,52
Nấm men (hàm lượng chất rắn khoảng 25%)	4,23

Sản xuất bánh quy ngọt

Nấm men dùng để sản xuất bánh quy được chuẩn bị như đã mô tả trước đó cho bánh mỳ.

Các thành phần để sản xuất bánh quy ngọt (bảng 5) được xử lý bằng cách trộn dầu, xiro và đường trong 1 phút ở tốc độ cao sử dụng bộ phận gắn cánh khuấy dẹt (máy trộn để bàn cổ điển KitchenAid). Chất làm nở và/hoặc nấm men được hòa tan vào thành phần nước và được bổ sung vào bát trộn. Các thành phần khô được bổ sung vào và trộn trong 6 phút nữa. Bột nhào thu được được để nguyên trong 20 phút. 13 g bột sản xuất bánh quy được ép trong khuôn tròn đường kính 65 mm và nướng ở 180°C trong 6 phút (hàm lượng ẩm mong muốn: 2,5-3,5%).

Bảng 5 | Hỗn hợp thành phần cuối cùng dùng để sản xuất bánh quy ngọt

	% tổng khối lượng
Dầu	16,6
Đường sucroza	16,9
Xiro ngô	6

Muối	0,50
Natri hydrocacbonat/	
Nấm men (DWB)	0,90
Bột đa công dụng	19,20
Bột yến mạch cán vỡ	38,00
Nước	1,90

Sản xuất bánh mỳ xoắn

Nấm men dùng để sản xuất bánh mỳ xoắn được chuẩn bị như đã mô tả trước đó cho bánh mỳ.

Bánh mỳ xoắn được sản xuất bằng cách đầu tiên trộn các thành phần khô (bảng 6), nước và nấm men trong 1 phút sử dụng máy trộn để bàn (máy trộn để bàn cổ điển Kitchen Aid) được lắp bộ phận gắn cánh khuấy. Chất làm mềm được bổ sung vào và bột nhào được trộn trong 5 phút nữa và sau đó lên men trong 30 phút ở 35°C. Bột nhào đã lên men được ép đùn qua khuôn 9 mm, có chiều dài khoảng 40 mm sau đó để nguyên trong 10 phút. Các viên này được nấu trong 20 giây ở 94°C trong bể kiềm (NaOH 1%). Sau đó, bánh mỳ xoắn được nướng trong 25 phút ở 204°C (độ ẩm mong muốn 15%). Sản phẩm đã nướng được sấy khô ở 119°C trong 25 phút (độ ẩm mong muốn 3,5%).

Bảng 6 | Hỗn hợp các thành phần cuối cùng sản xuất bánh mỳ xoắn

	% khối lượng thành phần
Bột mỳ	64,5
Nấm men	0,5
Chất làm nở	0,5
Chất làm mềm	2,00
Muối	1,00
Sucroza	2,00
Nước	29,50

Sản xuất cà phê

Nấm men dùng để sản xuất cà phê được chuẩn bị như đã mô tả trước đó cho bánh mỳ.

Lên men trực tiếp hạt cà phê

Hạt cà phê xanh (GCB) (Brazil Serra Negra) được nghiền thành bột (máy nghiền phân tích IKA, loại A11BS1). Nước lọc bằng cách thẩm thấu ngược (nước RO) được bổ sung vào ở tỷ lệ 75 mL trên 40 g bột GCB. 4 g nấm men dạng kem (hàm

lượng chất rắn 25%) hoặc 3 g nước RO cho đối chứng không bổ sung nấm men được bổ sung vào đĩa GCB và được lên men trong 20 giờ trong máy ủ lắc (250 vòng/phút 30°C). 10 g bột nhão đã lên men được rang trong máy đo độ ẩm IR (Ohaus MB45-2A0) trong 13 phút ở 200°C.

Chuẩn bị chất chiết cà phê xanh và xử lý bằng nấm men AR

Chất chiết cà phê xanh (GCE) được sản xuất bằng cách lắc nhiều lần các mẻ GCB trong nước. Cụ thể hơn, 500 g GCB được ngâm trong 16 giờ ở 70°C và sau đó, được lấy ra. Sau đó, các GCB tươi được ngâm sơ bộ trong nước trong 1 giờ ở 70°C trước khi ủ trong GCE trong 16 giờ ở 70°C. Quy trình ngâm các GCB tương tự trong GCE được lặp lại cho đến khi hàm lượng chất rắn tan đạt đến 18%.

GCE được xử lý bằng nấm men AR bằng cách ủ nấm men AR này ở các nồng độ khác nhau với GCE trong các khoảng thời gian khác nhau ở nhiệt độ phòng. Sau khi xử lý, GCE đã xử lý bằng nấm men AR được làm trong bằng cách ly tâm và được sử dụng để đo mức asparagin.

Định lượng acrylamit bằng UPLC-QDA

Các phân có kích thước là một khẩu phần ăn của các loại thực phẩm rắn được nghiền trong máy xử lý thực phẩm trước khi lấy mẫu. Các loại thực phẩm lỏng và dạng bột được lấy mẫu trực tiếp. Các mẫu 1,00 g được cân và chuyển vào các ống ly tâm 50 mL, và 1 mL chất chuẩn nội acrylamit được đánh dấu $^{13}\text{C}_3$ nồng độ 200 µg/kg và 9 mL nước được bổ sung vào. Sau đó, các ống này đều được đậy nắp và lắc bằng tay và lắc xoáy nhanh để trộn hỗn hợp trong ống. Các ống này được kẹp trong máy lắc quay tròn để trộn hỗn hợp trong ống trong 20 phút. Các ống này được ly tâm ở 9000 vòng/phút trong 15 phút bằng máy ly tâm Eppendorf 5810R. Lượng nhỏ 5 mL của lớp nước đã làm trong được lấy nhanh bằng pipet để lọc quay. Pipet này được cắm xuyên qua lớp dầu bên trên, tránh lớp chất rắn ở đáy dính vào đầu của pipet khi một phần pha nước được lấy ra. Đặt lượng nhỏ 5 mL vào ống lọc quay và ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/phút trong 2-4 phút. Nếu dịch lọc đông tụ, cắm ống lọc mới vào, chất lỏng chưa lọc được rót vào ống lọc mới này, và tiếp tục ly tâm cho đến khi hầu hết chất lỏng đi qua bộ lọc. Các cột Oasis HLB SPE được điều hòa bằng 3,5 mL metanol, sau đó bằng 3,5 mL nước; các phần metanol và nước được bỏ đi. Mỗi cột được nạp 1,5 mL chất chiết đã lọc. Chất chiết được cho đi qua nguyên liệu hấp thụ, sau đó là 0,5 mL nước.

Sau đó, cột này được rửa giải bằng 1,5 mL nước, và sản phẩm rửa giải thu được được thu gom để lấy ra Accucat SPE. Phía ngoài của cột Accucat SPE được đánh dấu ở chiều cao 1 mL chất lỏng trên tầng mang chất hấp thụ, và sau đó, cột A được điều hòa bằng 2,5 mL metanol, sau đó là 2,5 mL nước. Các phần metanol và nước được bỏ đi. Tất cả các sản phẩm rửa giải được thu gom từ Oasis SPE được nạp lên và rửa giải đến vạch đánh dấu 1 mL trước khi phần còn lại của các phần đã rửa giải được thu gom. Các phần này được chuyển vào các lọ thủy tinh nhỏ dung tích 2 mL dùng cho máy lấy mẫu tự động dùng để phân tích sắc ký lỏng/phổ khối (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry - LC-MS) trên hệ thống Waters ACQUITY UPLC H-Class ghép với bộ phát hiện khối lượng Waters ACQUITY QDa sử dụng các thông số cài đặt sau:

Thành phần pha di động: Dung dịch nước axit formic 0,1%, metanol 2%

Cột: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 2,1x50mm 1,8 μ m

Tốc độ dòng trên cột: 500 μ L/phút

Nhiệt độ cột: 20°C

Thể tích phun: 5 μ l

Thời gian rửa giải: 1 phút

Chế độ ion hóa: phun điện tử ion dương

Điện thế mao dẫn: 600 V

Điện thế hình nón: 5 V

Chế độ MS: theo dõi SIR m/z 72,04

Định lượng L-Asparagin trong chất chiết hạt cà phê bằng UPLC-PDA

Chất chiết hạt cà phê được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Dịch nổi thu được được pha loãng bằng nước Milli-Q để đo L-asparagin bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao có tên Waters Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) được trang bị bộ phát hiện dạng dãy điốt quang (Photodiode Array - PDA) (Acquity UPLC H-Class, Waters, Milford, MA, USA) và cột C18 Acquity UPLC BEH (1,7 μ m, 2,1 mm X 100 mm, Waters, Milford, MA, USA). L-asparagin có độ tinh khiết 99,6% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) được lấy để pha chế dung dịch chuẩn với khoảng nồng độ nằm trong khoảng từ 15 đến

500 pmol/ μ L để hiệu chỉnh và tính toán. L-asparagin trong cả hai mẫu và trong các dung dịch chuẩn được tạo dẫn xuất bằng kit tạo dẫn xuất có tên AccQ·Tag Ultra™ (Waters, Milford, MA, USA) để bổ sung nhóm mang màu vào để phát hiện độ hấp thụ của nó ở bước sóng 260 nm. Phân tích này được tiến hành với thể tích phun là 1 μ L và nhiệt độ của cột ở 43°C. Dung dịch đậm đặc rửa giải A và rửa giải B AccQ·Tag Ultra™ được mua từ Waters (Milford, MA, USA) để rửa giải theo gradient của dẫn xuất L-asparagin. Chế độ rửa giải chi tiết được thể hiện trong Bảng 7:

Bảng 7: Chế độ rửa giải:

Dung môi A: Dung dịch đậm đặc rửa giải A

Dung môi B: 10% dung dịch rửa giải B trong nước

Dung môi C: Nước

Dung môi D: Dung dịch đậm đặc rửa giải B

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	%A	%B	%C	%D
Ban đầu	0,7	10,0	0,0	90,0	0,0
0,29	0,7	9,9	0,0	90,1	0,0
5,49	0,7	9,0	80,0	11,0	0,0
7,10	0,7	8,0	15,6	57,9	18,5
7,30	0,7	8,0	15,6	57,9	18,5
7,69	0,7	7,8	0,0	70,9	21,3
7,99	0,7	4,0	0,0	36,3	59,7
8,59	0,7	4,0	0,0	36,3	59,7
8,68	0,7	10,0	0,0	90,0	0,0
10,20	0,7	10,0	0,0	90,0	0,0

Các kết quả

Đánh giá phương pháp sàng lọc một vòng đã biết để sàng lọc các thể đột biến không ức chế ASP3

Để tránh được NCR mà thường giữ *ASP3* ở trạng thái bị ức chế, phương pháp sàng lọc gây đột biến ngẫu nhiên mà chọn lọc các tế bào nấm men có khả năng sinh trưởng trên nguồn nitơ duy nhất D-Asparagin được sử dụng (60). Giống như tất cả các vi sinh vật đã biết khác, *Saccharomyces cerevisiae* không sử dụng D-axit amin. Tuy nhiên, enzym asparaginaza gắn kết thành tế bào II (ASP3) là duy nhất ở chỗ nó có thể phân giải D-asparagin, mặc dù không thực sự hiệu quả (64). Quan trọng là, asparaginaza I trong tế bào chất (ASP1) không thể phân giải D-asparagin.

Mặc dù việc phát triển trên D-asparagin chỉ ra rằng ASP3 được tạo ra nhưng nó cũng phải được biểu hiện trong các điều kiện NCR mạnh để được giải ức chế hoàn toàn. Do đó, phương pháp lựa chọn cũng kết hợp metylamin trong môi trường. *S. cerevisiae* không thể sử dụng metylamin làm nguồn nitơ. Tuy nhiên, metylamin cạnh tranh với các ion amoni cho các chất vận chuyển amoniac. Ngay trong tế bào, metylamin không tham gia vào các phản ứng chuyển hóa, nhưng làm cho NCR mạnh - tương đương với sự phát triển trên nguồn nitơ được ưu tiên của nấm men: amoniac (amoni sulfat). Do đó, metylamin là chất ức chế sinh trưởng (65, 66).

Việc nuôi cấy các tế bào trong môi trường chứa nguồn nitơ duy nhất là D-asparagin và metylamin đã thiết lập nên các điều kiện trong đó cách thức duy nhất để các tế bào có thể phát triển là biểu hiện *ASP3*, phân giải D-asparagin bên ngoài, và sau đó, nhập các ion amoni đã giải phóng. Đồng thời, các ion amoni sau khi giải phóng sẽ phải cạnh tranh với metylamin để được tế bào sử dụng để sinh trưởng. Do đó, các tế bào có mức biểu hiện *ASP3* lớn nhất sẽ có được ưu điểm chọn lọc nhờ các điều kiện ức chế của môi trường sinh trưởng. Quan trọng là, nấm men không thể sử dụng axit D-aspartic đã giải phóng để sinh trưởng.

Phương pháp chọn lọc này (D-asparagin và metylamin) trước đây đã được sử dụng để xác định các thể đột biến *ASP3* được giải ức chế trong chủng nấm men phòng thí nghiệm (DJ2-23C) (60). Các tác giả của phương pháp này đã lựa chọn các thể đột biến *ASP3* bằng cách cấy trực tiếp các tế bào đã được gây đột biến EMS lên các đĩa chọn lọc (với metylamin 100 mM (3,1 g/L) và D-asparagin 5 mM (0,66 g/L)). Điều này khiến cho các tác giả này đã phát hiện ra rất nhiều thể đột biến *ASP3* đã giải ức chế. Tuy nhiên, sau nhiều nỗ lực lặp lại vẫn chưa thể thu được được các kết quả giống như vậy đối với chủng men sản xuất bánh mỳ trong ngành công nghiệp liên quan.

Điều cần đặc biệt lưu ý là các tác giả của công trình nghiên cứu ban đầu (Kamerud and Roon 1986) có thể dễ dàng phát hiện ra các thể đột biến *ASP3* đã giải ức chế do họ sử dụng các chủng nấm men đơn bội để thí nghiệm. Việc sử dụng chủng dùng trong công nghiệp có hệ gen phức tạp hơn nhiều (thể tam bội, thể tứ bội, thể lệch bội lẻ)—làm cho việc phát hiện ra các thể đột biến đã giải ức chế trở nên khó khăn gấp bội. Điều này là do thể đột biến bất kỳ có kiểu hình lặn sẽ không được biểu hiện vì chúng sẽ nằm trong chủng đơn bội. Cũng có cơ hội có nhiều khả năng xảy ra hơn đối với đột biến lặn át hoặc nhiều tính trạng. Về cơ bản, đột biến đơn có lợi bất kỳ đều sẽ

bị lẫn tính dư thừa di truyền. Điều này hiếm khi xảy ra đối với chủng trong phòng thí nghiệm, đặc biệt là đối với các chủng có nền tảng đơn bội.

Phát triển chiến lược gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi để thu được nấm men có khả năng làm giảm acrylamit

Dựa vào việc nấm men sản xuất bánh mì trong công nghiệp không tuân theo chiến lược chọn lọc một vòng của Kamberud và Roon, vì vậy phương pháp sàng lọc này sẽ được thiết kế lại để kết hợp chiến lược tiến hóa thích nghi lặp lại với nhiều vòng gây đột biến gen (**Fig.1**). Mục đích của phương pháp mới này là làm tăng từ từ áp lực chọn lọc theo thời gian, kết hợp với gây đột biến nhiều lần, để cho phép biểu hiện *ASP3* đầy đủ —và do đó, phá vỡ asparagin —trong các điều kiện ức chế khác. Quan trọng là, các điều kiện chọn lọc cần để đảm bảo việc giải ức chế hoàn toàn đối với *ASP3* phải được làm tăng từ từ vì nồng độ cuối cùng của D-asparagin và metylamin được sử dụng để chọn lọc ngăn cản hoàn toàn sự phát triển của nấm men không được thích ứng. Do đó, chỉ có sử dụng kết hợp đặc hiệu giữa gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi mới có khả năng thu được kiểu hình AR.

Việc thu gom giống cây của các chủng nấm men dùng trong công nghiệp, có sẵn trên thị trường được sàng lọc về sự phát triển trên nguồn nitơ duy nhất là D-asparagin. Chỉ có một chủng dùng trong công nghiệp—chủng nấm men sản xuất bánh mì Nhật Bản – có khả năng phát triển đáng kể trên D-asparagin, điều đó cho thấy nó mang các gen *ASP3* tự nhiên. Chủng S288C trong phòng thí nghiệm được sử dụng làm chủng đối chứng dương, vì nó được biết là mang *ASP3*.

Tại thời điểm zero, chủng kiểu đại trước tiên được cấy chuyển trong môi trường tối thiểu chứa D-asparagin (10 g/L) làm nguồn nitơ duy nhất (sucroza làm nguồn cacbon). Trong môi trường này, kiểu đại thể hiện tốc độ sinh trưởng rất chậm, và trong các điều kiện này, tế bào với các đột biến tự nhiên cho phép biểu hiện *ASP3* cao hơn không đáng kể sẽ có ưu điểm chọn lọc. Để đưa vào biến dị, các tế bào được gây đột biến bằng tia UV trên cơ sở hằng tuần, với các liều UV thay đổi (10-99% liều gây chết). Chủng được cấy chuyển liên tục (trên cơ sở hằng ngày) và số đọc OD₆₀₀ được lấy để theo dõi sự sinh trưởng tương đối. Vào mỗi lần cấy chuyển, các tế bào được cấy vào môi trường mới với OD₆₀₀ vào thời điểm ban đầu cũng bằng 0,01. Trong khoảng thời gian bốn tuần, tốc độ sinh trưởng của nấm men đã được gây đột biến trên môi

trường chọn lọc được quan sát thấy là gia tăng, sao cho nó tương đương với tốc độ sinh trưởng trên môi trường không chọn lọc. Điều này gợi ý rằng các tác giả sáng chế đã chọn lọc các tế bào có sự biểu hiện *ASP3* tăng trong điều kiện không gây cảm ứng, do đó tạo ra nền tảng di truyền tốt để bắt đầu chọn lọc các thể đột biến đã được giải ức chế (trong điều kiện NCR mạnh hoặc điều kiện không gây cảm ứng) với khả năng biểu hiện cao nhất.

Sau một tháng, metylamin được đưa vào môi trường nuôi cấy để điều khiển NCR mạnh, tức là điều kiện ức chế hoàn toàn đối với *ASP3*. Bằng cách sử dụng dòng được gây đột biến làm điểm bắt đầu, lượng metylamin tối thiểu được bổ sung vào môi trường sinh trưởng (0,05 g/L). Điều này làm giảm đáng kể tốc độ sinh trưởng của các tế bào xuống cùng tốc độ như khi bắt đầu cấy chuyển trên môi trường chọn lọc.

Trong bốn tháng tiếp theo, các dòng sinh trưởng nhanh nhất được cho qua cấy chuyển liên tục với sự có mặt của metylamin và gây đột biến hằng tuần bằng tia UV (như được mô tả trên đây). Khi tốc độ sinh trưởng với sự có mặt của metylamin tương đương với tốc độ sinh trưởng khi không có mặt metylamin, các khuẩn lạc riêng lẻ thu được bằng cách rĩa cấy trên môi trường chọn lọc rắn chứa metylamin. Các khuẩn lạc cho thấy sự sinh trưởng nhanh chóng (tức là hình dạng quan sát bằng mắt thường nhanh nhất và kích thước khuẩn lạc lớn nhất so với kích thước trung bình xấp xỉ của các khuẩn lạc trên đĩa) được lấy và thử nghiệm về hoạt tính phân giải L-asparagin. Sau đó, các khuẩn lạc thể hiện hoạt tính cao được cấy chuyển tiếp và được gây đột biến bằng lượng metylamin nhiều hơn tăng dần (0,05 g/L đến 12 g/L metylamin) để làm tăng áp lực chọn lọc, và do đó cải thiện hoạt tính phân giải L-asparagin. Lưu ý là, việc gây đột biến ở các giai đoạn khác nhau trong khoảng thời gian cấy chuyển liên tục tạo ra các dòng mới. Chỉ các dòng thể hiện hoạt tính phân giải L-asparagin được cải thiện, so với giống cấy trước, mới được tiến hóa tiếp.

Để làm đối chứng, dòng nấm men kiểu dại chưa từng được gây đột biến được giữ lại. Dòng này cho phép xác định xem liệu một mình tiến hóa thích nghi (không có quá trình gây đột biến) có đủ để tạo ra kiểu hình mong muốn (*ASP3* được giải ức chế hoàn toàn), hoặc liệu kiểu hình thu được có phải là kết quả của phương pháp thiết kế tiến hóa (tức là tạo ra biến dị để chọn lọc bằng cách gây đột biến bằng tia UV).

Nấm men AR phân giải asparagin trong điều kiện NCR

Sự biểu hiện của *ASP3*, và do đó là khả năng phân giải asparagin của nấm men bánh mỳ, bị ức chế ở hầu hết các điều kiện sinh trưởng. Để tối đa hóa chức năng của các chủng AR, điều quan trọng là phải phá vỡ các cơ chế NCR thông thường kiểm soát sự biểu hiện *ASP3* là quan trọng. Như vậy, chủng AR cần phải phân giải asparagin ngay cả khi được cho sinh trưởng trong môi trường giàu dinh dưỡng. Để kiểm tra chức năng của nấm men đã được làm thích nghi, khả năng phân giải asparagin của chúng so với chủng bố mẹ kiểu dại chưa thích nghi được so sánh.

Từ quy trình tiến hóa thích nghi, ba biến thể chính được nhận diện với kiểu hình mong muốn (sinh trưởng trên D-asparagin với sự có mặt của metylamin)—RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Khi các chủng này được kiểm tra hoạt tính phân giải asparagin, mỗi trong số các chủng này thể hiện mức độ phân hủy asparagin cao ngay cả khi được cho sinh trưởng ở các điều kiện giàu dinh dưỡng (ức chế) (Fig.2). So với kiểu dại—không có hoạt tính đáng kể trong thời gian lên đến ba giờ, và chỉ có hoạt tính tối thiểu sau đó (hơn 60% L-asparagin còn lại)—mức hoạt tính phân giải L-asparagin cao quan sát thấy ở mỗi trong số các chủng AR, ngay cả khi thời gian thử nghiệm chỉ là một giờ (RBAR-01: 82% L-asparagin còn lại tại thời điểm 1 giờ; RBAR-02: 59% L-asparagin còn lại tại thời điểm 1 giờ; RBAR-03: 54% L-asparagin còn lại tại thời điểm 1 giờ). Quan trọng là, RBAR-02 và RBAR-03 thể hiện tốt hơn một cách đáng kể ở thời điểm một và hai giờ khi so với chủng đối chứng GMO được thiết kế để biểu hiện cơ định *ASP3*. Điều này củng cố thêm ý kiến cho rằng việc tiến hóa thích nghi thường có thể tạo ra các giải pháp chức năng tốt hơn việc thiết kế đảo ngược nhắm đến con người. Hơn thế nữa, các dữ liệu này gợi ý rằng nấm men AR đã tiến hóa thích nghi sẽ có ứng dụng tăng trong ngành công nghiệp mà ở đó thường mong muốn thời gian ủ ngắn—để đem lại các lợi ích về kinh tế và tính an toàn thực phẩm. Fig.1 và 2 cùng nhau cho thấy rằng quy trình tiến hóa thích nghi được sử dụng đã thay đổi thành công các điều kiện NCR thông thường sao cho nấm men AR phân giải asparagin ngay cả khi được cho sinh trưởng trong môi trường giàu dinh dưỡng (YEG). Quan trọng là, cả ba biến thể AR thu được từ các dòng đột biến riêng rẽ, do đó có khả năng là kiểu hình của chúng—và các cơ chế tác dụng đi kèm—đều tiến hóa một cách độc lập.

Tiến hóa thích nghi lặp lại là quan trọng để tạo ra các chủng AR

Như đã nêu ở trên, phương pháp chọn lọc một vòng của Kamerud và Roon không thể áp dụng cho các chủng nấm men bánh mỳ công nghiệp. Do đó, phương pháp tiến hóa thích nghi mới, lặp lại được phát triển để thu được chủng AR có khả năng phân giải L-asparagin. Mục tiêu của phương pháp mới này là làm tăng từ từ áp lực chọn lọc theo thời gian, kết hợp với việc gây đột biến lặp, để đạt được tính đa dạng di truyền đủ để cho phép biểu hiện đủ *ASP3*—và do đó phân hủy asparagin—ở các điều kiện ức chế khác.

Để khẳng định sự cần thiết của quy trình lặp lại này đối với việc phát triển các chủng AR, sự sinh trưởng của các chủng AR cuối, cũng như bố mẹ kiểu đại của chúng, được kiểm tra ở các mức áp lực chọn lọc khác nhau. Các chủng được cấy đĩa lên môi trường chọn lọc tối thiểu (YEG + D-asparagin), môi trường chọn lọc vừa phải được sử dụng bởi Kamerud và Roon (YEG + D-asparagin + 3,1 g/L metylamin), và môi trường chọn lọc cao được sử dụng trong nghiên cứu này (YEG + D-asparagin + 12 g/L metylamin). Như mong đợi, tất cả các chủng đều phát triển đồng đều tốt trong các điều kiện không chọn lọc (Fig.3, đĩa bên trái), nhưng chỉ các chủng AR có khả năng phát triển trong hầu hết các điều kiện chọn lọc (Fig.3, đĩa bên phải). Phù hợp với các kết quả trước đó, chủng bố mẹ có khả năng sinh trưởng ở các điều kiện chọn lọc vừa phải, mặc dù chậm hơn chủng AR đã tiến hóa thích nghi (Fig.3, đĩa ở giữa). Sự chênh lệch về mặt sinh trưởng này là yếu tố biểu thị của các thay đổi tiến hóa của các chủng AR mà làm cho chúng có thể phát triển thành công trong môi trường chọn lọc cao hơn. Các dữ liệu này cùng nhau nhấn mạnh sự cần thiết của áp lực chọn lọc tăng lặp lại để lựa chọn tính đa dạng di truyền kế tiếp (sự tiến hóa) theo thời gian. Quả thực, chỉ có phương pháp lặp lại này có khả năng tạo ra các chủng nấm men bánh mỳ công nghiệp có khả năng sinh trưởng ở các điều kiện chọn lọc cao và, do đó, tác động đến kiểu hình AR đặc trưng.

Các chủng nấm men AR là đời con khác biệt về mặt chức năng, được làm thích nghi tiến hóa của chủng kiểu đại

Việc tiến hóa thích nghi định hướng cho phép sự phát triển có tính đặc hiệu cao của kiểu hình mới (ví dụ, sự phân giải asparagin cơ định). Với việc chứng minh kiểu hình đã tiến hóa của các chủng AR (Fig.2 và 3), điều quan trọng là phải đảm bảo các chủng này thực sự là đời con của chủng kiểu đại, chứ không phải là chủng tạp bất kỳ nhận được trong quá trình nuôi cấy. Để xác nhận dòng của các chủng AR (RBAR-01,

RBAR-02 và RBAR-03), PCR dấu vân tay inter-delta được sử dụng để định kiểu mỗi chủng AR dựa vào bố mẹ kiểu đại. Trình tự delta nằm bên sườn các gen nhảy ngược TY1 và TY2 được phân phối qua toàn bộ hệ gen nấm men. Do tỷ lệ đột biến cao trong các gen nhảy ngược này, sự khuếch đại của trình tự intra-delta dẫn đến tổ hợp nhiều dải được định cỡ có thể được sử dụng để nhận diện các chủng nấm men cụ thể (61). Dấu vân tay inter-delta của RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03 khuếch đại số lượng giống nhau, sự phân bố kích cỡ, và mật độ tương đối của các dải, khi so sánh với chủng kiểu đại này (Fig.4, các hàng so sánh 3, 4, 5 và 6). Điều này gợi ý rằng tất cả các chủng AR đã thích nghi đều thu được từ cùng một chủng bố mẹ, do đó có thể là chúng sẽ có chung các tính chất tương đồng ví dụ, động học sinh trưởng, sức sống, và tính phù hợp để sử dụng trong ngành công nghiệp bánh nướng. Quan trọng là, chủng kiểu đại và chủng AR được định kiểu khác so với chủng đối chứng nấm men phân giải asparagin S288C và GMO không liên quan (Fig.4, hàng 1 và 7).

Chủng AR biểu hiện cơ định asparaginaza II cũng như phân giải L-asparagin

Hệ NCR của nấm men cho phép tế bào sử dụng nguồn nitơ phức hợp theo cách hiệu quả nhất có thể. Tức là, khi có sẵn nhiều nguồn có chất lượng khác nhau, NCR điều hòa sự biểu hiện gen dị hóa sao cho các tế bào ưu tiên sử dụng nguồn có sẵn có chất lượng tốt nhất trước khi chuyển đến nguồn tiếp theo. Quả thực, môi trường sinh trưởng giàu dinh dưỡng như YEG chứa phức hợp gồm nhiều nguồn nitơ bao gồm amoni, axit amin tự do, peptit, và protein. Do đó, trong suốt quá trình sinh trưởng của nấm men trong YEG, số lượng và chất lượng của nitơ sẵn có—cũng như hoạt tính NCR—là không đổi. Như vậy, mặc dù các chủng AR có khả năng phân giải L-asparagin được tăng cao khi được cho sinh trưởng qua đêm trong YEG (Fig.2), sự phân hủy asparagin vẫn có thể bị giới hạn bởi môi trường nitơ cụ thể ở thời điểm này.

Để kiểm tra xem sự biểu hiện gen *ASP3*—và hoạt tính phân giải L-asparagin sau đó—có đặc hiệu với thời điểm cụ thể hay thay vào đó là cơ định, thử nghiệm khoảng thời gian được thực hiện trong đó nấm men được lấy mẫu trong suốt giai đoạn 24 giờ. Sau giai đoạn nuôi cấy qua đêm ban đầu, số lượng tế bào bằng nhau của mỗi chủng được cấy vào môi trường nuôi cấy YEG mới và được cho sinh trưởng trong 24 giờ. Các mẫu từ mỗi chủng được lấy ở các khoảng thời gian là 6 giờ để đo cả sự phân hủy L-asparagin (thử nghiệm chuẩn 1 giờ), cũng như sự biểu hiện gen *ASP3* qua qPCR.

Như được thể hiện trên Fig.5A, tất cả các chủng sinh trưởng ở tốc độ tương đương, cho phép thu được số lượng tế bào bằng nhau ở mỗi thời điểm.

Về việc phân hủy L-asparagin, cả RBAR-02 và RBAR-03 đều có khả năng phân giải hoàn toàn L-asparagin trong toàn bộ khoảng thời gian (L-asparagin còn lại ít hơn 10%), trong khi RBAR-01 có khả năng dị hóa L-asparagin mức trung bình trong cùng khoảng thời gian đó (L-asparagin còn lại trung bình là 60%). Quan trọng là, chủng kiểu dại này không thể hiện khả năng phân hủy L-asparagin đáng kể bất kỳ tại thời điểm bất kỳ trong giai đoạn thử nghiệm (Fig.5B). Lưu ý là, các dữ liệu này phù hợp với sự phân giải L-asparagin quan sát được trước đó trên Fig.2.

Khi được thử nghiệm về sự biểu hiện *ASP3*, tất cả các chủng AR đều thể hiện sự biểu hiện cơ định *ASP3* (Fig.5C). Tính trung bình của tất cả các thời điểm, RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03 thể hiện giá trị *ASP3* lần lượt lớn hơn gấp 4,7, 9,6, và 10,5 lần so với kiểu dại (Fig.5C). Thú vị là, độ lớn tương đối của sự biểu hiện cơ định phản ánh khả năng phân giải L-asparagin của mỗi chủng trong toàn bộ khoảng thời gian (so sánh Fig.5B và 5C). Cuối cùng, sự biểu hiện *ASP1* ở tất cả các chủng AR không thay đổi so với kiểu dại (Fig.5D), cho thấy rằng sự phân giải L-asparagin quan sát được là kết quả của asparaginaza gắn thành tế bào II (*ASP3*), hơn là của asparaginaza I (*ASP1*) bào tan. Kết hợp cùng nhau, các dữ liệu này cũng chỉ ra rằng các chủng AR biểu hiện cơ định *ASP3* và phân giải theo cách cơ định L-asparagin do kết quả của sự tiến hóa thích nghi của chúng.

Chủng AR thể hiện động học asparaginaza II được tăng cường và đặc trưng

Quá trình dị hóa asparagin sản sinh axit aspartic và amoniac, cả hai chất này đều có thể được chuyển hóa thành hợp chất không mùi vị như pyrazin trong quá trình nấu sử dụng nhiệt độ. Do đó, trong các ứng dụng sản xuất thực phẩm nhất định, có thể có lợi nếu sử dụng nấm men AR có mức hoạt tính asparaginaza II dưới mức tối đa để tránh việc tạo ra chất không mùi vị. Để kiểm tra động học asparaginaza II trong mỗi chủng nấm men AR, các giống cấy qua đêm được cấy vào môi trường YEG chứa L-asparagin đến số lượng tế bào cố định. Sau đó, các mẫu được lấy ở các khoảng 30 phút và L-asparagin còn lại được phân tích. Mặc dù cả ba chủng AR đều thể hiện sự phân hủy L-asparagin so với mẫu đối chứng kiểu dại, động lực phân hủy L-asparagin không bằng nhau ở các chủng AR (Fig.6). Cụ thể hơn, RBAR-01 có tỷ lệ phân hủy L-

asparagin thấp hơn so với cả RBAR-02 và RBAR-03 (RBAR-01: 82% L-asparagin còn lại tại thời điểm 90 phút), trong khi RBAR-02 và RBAR-03 là tương tự nhau (RBAR-02: 54% L-asparagin còn lại tại thời điểm 90 phút; RBAR-03: 66% L-asparagin còn lại tại thời điểm 90 phút). Các dữ liệu này phù hợp với sự phân hủy L-asparagin quan sát được trên Fig.2 và, được lấy kết hợp với các dữ liệu còn lại, ủng hộ kiểu hình trong nấm men AR đã tiến hóa thích nghi.

Chúng AR thể hiện sự biểu hiện gen khác nhau đối với các gen được điều hòa bởi NCR

Do bản chất không đặc hiệu cố hữu của nó, việc gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi có khả năng thay đổi sự biểu hiện của nhiều gen khác nhau, ngoài gen đang quan tâm. Với việc xác định rằng các chủng nấm men AR thực sự biểu hiện cơ định *ASP3* và phân giải L-asparagin với sự có mặt của nguồn nitơ có chất lượng trong các điều kiện NCR hoạt tính khác (Fig.2, 5, và 6), các tác giả sáng chế đã đánh giá profin biểu hiện gen tổng của nấm men AR.

Để làm điều này, một lượng cố định các tế bào từ các giống cây qua đêm được cấy vào môi trường YEG mới và các giống cây được ủ trong sáu giờ. Sau đó, toàn bộ ARN được chiết từ các mẫu và thư viện đọc trình tự ARN được tạo cấu trúc từ cADN phiên mã ngược (mỗi poly dT). Việc đọc trình tự được thực hiện trên nền kiểu Illumina HiSeq2500 năng suất cao trong cấu hình ghép cặp đầu cuối 2x100bp.

Trung bình, 67,5 triệu giá trị đọc đối với mỗi chủng thu được tương đương với 6.818 megabazơ và độ bao phủ gấp khoảng 560 lần (giả sử hệ gen đơn bội 12Mb). Dữ liệu đọc trình tự thường có chất lượng rất cao, với 94% điểm Q lớn hơn hoặc bằng 30, và điểm Q trung bình là 37.

Các giá trị đọc thô đối với mỗi chủng được làm gọn và lọc chất lượng (điểm Q lớn hơn hoặc bằng 30) trước khi lập bản đồ đối với hệ gen tham chiếu S288C. Trung bình 97,6% giá trị đọc được sắp thẳng thành công. Các giá trị đọc sau khi sắp thẳng được sử dụng để tạo cấu trúc cho mỗi số giá trị đọc gen mà sau đó tạo ra cơ sở cho việc phân tích sự biểu hiện gen khác nhau (DEG). Với mỗi chủng AR, sự thay đổi log2 lần của mỗi gen so với kiểu đại được tính toán (Fig.7). Các gen có giá trị thay đổi độ lớn hơn 1,5 lần và số giá trị đọc của kiểu đại ít nhất là 100 được xem là được biểu hiện khác biệt (DE). Fig.8A và bảng 8 so sánh mức độ biểu hiện của DEG trong mỗi chủng

AR. Bằng các tiêu chuẩn đối với DEG này, 81(1,6%), 73 (1,4%), và 84 (1,6%) DEG (trong số 5121 ORF S288C được kiểm tra) được quan sát thấy lần lượt trong mỗi trong số RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Ngoài ra, 50 trong số 113 (44,2%) DEG là chung với cả ba chủng, trong khi 75 (66,4%) DEG là chung với ít nhất hai trong số các chủng AR (Fig.8B). Bằng phân tích RNAseq, *ASP3* nằm trong số các gen đỉnh được điều hòa tăng trong mỗi trong số các chủng AR (bảng 8). Thực tế, *ASP3* được điều hòa tăng lần lượt 4,9, 7,8 và 8,9 lần trong RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03, phù hợp với dữ liệu phân giải L-asparagin và dữ liệu qPCR thu được trên Fig.5B và 5C.

Ngoài *ASP3*, việc phân tích DEG cho thấy sự điều hòa khác nhau về cơ bản của nhiều gen NCR (Fig.9A). Tổng cộng, 15 (19,0%), 15 (19,0%), và 17 (21,2%) trong số 79 gen được kiểm soát NCR đã biết được biểu hiện khác nhau lần lượt trong RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03. Tất cả các giá trị làm giàu này đều rất có ý nghĩa thống kê bởi thử nghiệm chính xác Fisher ($p \leq 0,0001$).

Cuối cùng, để phân tích con đường và mạng lưới di truyền bị tác động trong nấm men AR theo quan điểm bao trùm, phân tích bản thể gen của DEG cũng được thực hiện trong mỗi trong số các chủng AR (bảng 9). Trong khi nhiều quá trình sinh học, các ngăn tế bào, và các chức năng phân tử bị tác động đáng kể, rõ ràng nhất là sự mất điều hòa hàng loạt đối với việc vận chuyển chất dinh dưỡng ở các chủng AR, đặc biệt là vận chuyển axit amin (Fig.9A, bảng 8 và 9). Thực tế, nhiều DEG đỉnh (cả được điều hòa tăng và điều hòa giảm) là enzym permeaza, bao gồm UGA4, GAP1, MEP2, DAL4, DAL5, PUT4, OPT2, HXT5, HXT4, HXT10, HXT11, HXT14, HXT9, MUP1, TAT1, MUP3, và GNP1 (Fig.9A và Bảng 8).

Kết hợp cùng nhau, các dữ liệu này chỉ ra rằng nấm men AR tiến hóa thích nghi có profin biểu hiện gen khác biệt đáng kể so với bố mẹ chưa tiến hóa của chúng. Ngoài ra, con đường chính bị tác động trong nấm men AR bao gồm con đường kiểm soát NCR và vận chuyển axit amin.

Toàn bộ ARN được thu từ chủng kiểu đại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03) trong quá trình sinh trưởng theo hàm mũ trong YEG. Thư viện đọc trình tự ARN (TruSeq v3)—thu được từ toàn bộ ARN—được đọc trình tự trên nền kiểu Illumina HiSeq2500 năng suất cao trong cấu hình ghép cặp đầu cuối 2x100 bp. Các giá trị đọc ban đầu được lọc về chất lượng và được lập bản đồ đối với

hệ gen tham chiếu S288C. Các giá trị thay đổi $\log_2$ lần (so với kiểu dại) được tính cho mỗi trong số 6.604 ORF của nấm men (đã kiểm tra, không đặc trưng, và không chắc chắn). Các gen đã biểu hiện khác biệt được gọi tên theo các tiêu chuẩn sau đây: $\geq$ thay đổi $|1,5| \log_2$ lần & ≥ 100 số đếm trong nấm men kiểu dại. Xem bảng 8.

Bảng 8: Gen biểu hiện khác nhau ở các chủng nấm men AR.

ID gen	Tên gen	Mô tả	RBAR-01 $\log_2$ FC ^a	RBAR-02 $\log_2$ FC	RBAR-03 $\log_2$ FC
Gen được điều hòa tăng ($\geq 1,5 \log_2$)					
YKR034W	DAL80	Chất điều tiết âm của nhiều con đường phân giải nitơ	3,408	4,596	4,776
YDL210W	UGA4	GABA (gamma-aminobutyrat) permeaza	2,399	3,374	3,658
YKR039W	GAP1	Axit amin phổ biến permeaza	2,528	3,277	3,254
YLR157C	ASP3-2	L-asparaginaza II thành tế bào liên quan đến quá trình dị hóa asparagin	2,323	3	3,172
YLR160C	ASP3-4	L-asparaginaza II thành tế bào liên quan đến quá trình dị hóa asparagin	2,282	2,955	3,161
YLR155C	ASP3-1	L-asparaginaza II thành tế bào liên quan đến quá trình dị hóa asparagin	2,298	2,959	3,156
YLR158C	ASP3-3	L-asparaginaza II thành tế bào liên quan đến quá trình dị hóa asparagin	2,283	2,943	3,132
YNL142W	MEP2	Amoni permeaza liên quan đến sự sinh trưởng giả nấm	2,359	2,505	2,847
YIR028W	DAL4	Allantoin permeaza	1,823	2,557	2,655
YJR152W	DAL5	Allantoat permeaza	1,664	2,559	2,474
YJL052W	TDH1	Glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH), isozym 1	2,351	2,124	2,297
YHR174W	ENO2	Enolaza II, phosphopyruvat hydrataza	2,325	1,933	2,257
YOR348C	PUT4	Prolin permeaza	2,046	2,677	2,222
YLR164W	SHH4	Cấu trúc dưới phân tử xen kẽ giả định của suxinat dehydrogenaza (SDH)	1,832	2,053	2,188
YKL152C	GPM1	Phosphoglyxerat mutaza dạng tetrame	2,146	1,884	2,135
YPR194C	OPT2	Chất vận chuyển oligopeptit	1,773	1,723	2,099
YAL038W	CDC19	Pyruvat kinaza	2,148	1,671	2,085
YIR032C	DAL3	Ureidoglycolat lyaza	1,638	1,847	2,085
YGR254W	ENO1	Enolaza I, phosphopyruvat hydrataza	2,014	1,688	1,976
YPL223C	GRE1	Hydrophilin thiết yếu trong quá trình hút ẩm-tái hydrat hóa	2,376	1,71	1,949
YKL060C	FBA1	Fructoza 1,6-bisphosphat aldolaza	1,848	1,536	1,89
YPL054W	LEE1	Protein ngón tay kềm có chức năng chưa biết	1,449	1,823	1,844
YKR097W	PCK1	Phosphoenolpyruvat carboxykinaza	1,626	1,055	1,83
YMR175W	SIP18	Hydrophilin liên kết phospholipit	1,875	1,308	1,795
YHR096C	HXT5	Chất vận chuyển hexoza có ái lực trung bình với glucoza	1,767	1,855	1,756
YDR399W	HPT1	Hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza dạng đime	1,468	1,434	1,741
YPL265W	DIP5	Dicarboxylic amino axit permeaza	1,288	1,671	1,702
YOR028C	CIN5	Yếu tố phiên mã khóa kéo loxin cơ bản (bZIP) của họ yAP-1	1,4	1,476	1,68
YDL222C	FMP45	Protein màng nguyên định vị ở ty thể	1,767	1,67	1,618
YAL062W	GDH3	Glutamat dehydrogenaza phụ thuộc NADP(+)-	1,606	0,843	1,543
YEL065W	SIT1	Chất vận chuyển ferrioxamin B	1,134	1,1	1,54
YMR303C	ADH2	Dehydrogenaza rượu ức chế glucoza II	1,49	1,362	1,523
YOL086C	ADH1	Dehydrogenaza rượu	1,571	1,342	1,522
Gen điều hòa giảm ($\geq -1,5 \log_2$)					

YCR106W	RDS1	Yếu tố phiên mã cụm kẽm giả định	--	--	-8,722
YCR104W	PAU3	Thành viên của họ đa gen seripauperin	-6,071	--	-6,925
YHR092C	HXT4	Chất vận chuyển glucoza ái lực cao	-3,317	-3,409	-3,456
YLR307W	CDA1	Kitin deaxetylaza	-1,954	-1,404	-3,392
		Protein cần để tái tổ hợp và tách nhân của quá trình giảm phân			
YGL183C	MND1		-2,213	-2,393	-3,269
YFL011W	HXT10	Chất vận chuyển hexoza giả định	-3,191	-2,056	-3,044
YCL064C	CHA1	L-serin (L-threonin) deaminaza dị hóa	-2,595	-1,296	-2,881
YGR055W	MUP1	Methionin permeaza ái lực cao	-2,547	-2,678	-2,69
		Protein liên quan đến việc kiểm soát sự tách nhân của quá trình giảm phân			
YHR184W	SSP1		-2,031	-2,597	-2,585
YGL184C	STR3	Xystathionin beta-lyaza thuộc peroxisom	-2,243	-2,394	-2,528
YJL223C	PAU1	Thành viên của họ đa gen seripauperin	-0,731	-0,918	-2,492
YLR303W	MET17	O-axetyl homoserin-O-axetyl serin sulfhydrylaza	-2,128	-2,467	-2,455
YAL012W	CYS3	Xystathionin gamma-lyaza	-1,912	-2,143	-2,355
YDL227C	HO	Endonucleaza đặc hiệu vị trí	-1,468	-2,012	-2,322
		Chất vận chuyển hexoza giả định gần giống với Hxt9p			
YOL156W	HXT11		-2,246	-1,749	-2,322
YBR040W	FIG1	Protein màng nguyên cần để liên kết hiệu quả	-1,11	-3,297	-2,285
		Protein có độ tương đồng với các thành viên họ chất vận chuyển hexoza			
YNL318C	HXT14		-2,432	-3,297	-2,285
		Chất vận chuyển hexoza giả định gần giống với Hxt11p			
YJL219W	HXT9		-2,316	-1,597	-2,17
		Chất vận chuyển axit amin đối với valin, loxin, isoloxin, và tyrosin			
YBR069C	TAT1		-2,001	-1,691	-2,105
YHL036W	MUP3	Methionin permeaza ái lực thấp	-1,963	-2,155	-2,098
YNR075W	COS10	Protein có chức năng chưa biết	-2,381	-1,968	-2,089
YHR216W	IMD2	Inosin monophosphat dehydrogenaza	-2,175	-1,872	-2,075
YDR522C	SPS2	Protein biểu hiện trong quá trình tạo bào tử	-2,191	-1,149	-2,044
YDR508C	GNP1	Glutamin permeaza ái lực cao	-2,019	-1,698	-2,035
YJR137C	MET5	Cấu trúc dưới phân tử sulfit reductaza beta	-1,762	-1,89	-1,978
		Protein có sự biểu hiện được cảm ứng trong quá trình tạo bào tử			
YOR313C	SPS4		-1,539	-1,182	-1,977
YHR183W	GND1	6-phosphogluconat dehydrogenaza (khử carboxyl)	-1,718	-2,108	-1,937
YLR461W	PAU4	Thành viên của họ đa gen seripauperin	-1,861	-1,404	-1,907
YBR073W	RDH54	ATPaza phụ thuộc ADN	-1,658	-1,96	-1,831
YLL063C	AYT1	Axetyltransferaza	-1,563	-1,686	-1,809
		Protein được bao gồm trong việc điều hòa quá trình sinh tổng hợp ergosterol			
YOR237W	HES1		-2,082	-1,569	-1,798
		Protein liên quan đến việc ráp thành bào tử phía ngoài			
YJL038C	LOH1		-1,67	-0,476	-1,786
		Chất vận chuyển glucoza ái lực thấp của siêu họ yếu tố hỗ trợ chính			
YDR345C	HXT3		-1,698	-1,718	-1,755
YLR308W	CDA2	Kitin deaxetylaza	-1,638	-1,918	-1,726
		Yếu tố phiên mã giả định, chứa miền kết hợp			
YDR501W	PLM2	Forkhead	-1,555	-1,815	-1,724
YKL001C	MET14	Adenylylsulfat kinaza	-1,519	-1,754	-1,7
		Protein không mang chức năng có độ đồng nhất với IMP dehydrogenaza			
YAR073W	IMD1		-1,574	-1,838	-1,7
YNL277W	MET2	L-homoserin-O-axetyltransferaza	-1,52	-1,766	-1,689
YOR183W	FYV12	Protein chưa biết chức năng	-2,234	-0,877	-1,672
YLR343W	GAS2	1,3-beta-glucanosyltransferaza	-1,316	-1,529	-1,655
YNR076W	PAU6	Thành viên của họ đa gen seripauperin	-1,468	-0,717	-1,644
		Cấu trúc dưới đơn vị lớn isoform chính của ribonucleotit-diphosphat reductaza			
YER070W	RNR1		-1,319	-1,211	-1,63
YCR107W	AAD3	Aryl-dehydrogenaza rượu giả định	-1,387	-1,739	-1,63
		Protein đặc hiệu quá trình giảm phân đối với việc ráp phức hệ sợi ghép			
YHR153C	SPO16		-1,731	-0,749	-1,585
YDR542W	PAU10	Protein chưa biết chức năng	-2,432	-1,049	-1,585
YBL031W	SHE1	Protein thoi vô sắc	-1,258	-1,123	-1,533

YER103W	SSA4	Protein sốc nhiệt được cảm ứng cao khi có sức ép	-1,269	-1,409	-1,527
YER091C	MET6	Methionin synthaza không phụ thuộc cobalamin	-1,214	-1,506	-1,509
YHR014W	SPO13	Chất điều tiết quá trình giảm phân	-1,573	-1,286	-1,509
YLR084C	RAX2	Protein N-glycosyl hóa	-1,304	-1,042	-1,508
YLR437C	DIF1	Protein điều hòa việc định vị nhân của Rnr2p và Rnr4p	-1,316	-1,143	-1,506

^a thay đổi số lần

Các gen biểu hiện riêng biệt được nhận diện trong bảng 8 được phân tích bằng phương pháp phân tích sự làm giàu GO (bảng 9). Giá trị p của quá trình làm giàu được hiệu chỉnh cho việc kiểm tra nhiều lần bằng phương pháp Holm-Bonferroni.

Bảng 9: Phương pháp phân tích làm giàu bản thể gen (GO) ở các chủng nấm men AR.

Quá trình sinh học				
Thuật ngữ gen	Giá trị p của quá trình làm giàu	Gen được làm giàu	Phần trăm DEG ^a	Phần trăm hệ gen
Quá trình chuyển hóa axit amin họ aspartat	1,8E-06	12	7,0%	0,2%
Quá trình chuyển hóa oxoaxit	3,1E-05	25	14,5%	0,5%
Quá trình chuyển hóa axit hữu cơ	3,2E-05	25	14,5%	0,5%
Quá trình chuyển hóa axit carboxylic	7,2E-05	24	14,0%	0,5%
Vận chuyển xuyên màng axit amin	9,8E-05	8	4,7%	0,2%
Quá trình chuyển hóa hợp chất nitơ hữu cơ	1,2E-04	30	17,4%	0,6%
Vận chuyển xuyên màng axit hữu cơ	2,1E-04	8	4,7%	0,2%
Vận chuyển hexoza	2,4E-04	7	4,1%	0,1%
Vận chuyển monosacarit	2,4E-04	7	4,1%	0,1%
Quá trình sinh tổng hợp axit amin chứa lưu huỳnh	5,3E-04	8	4,7%	0,2%
Quá trình chuyển hóa phân tử nhỏ	6,9E-04	32	18,6%	0,6%
Quá trình dị hóa axit amin họ aspartat	9,5E-04	5	2,9%	0,1%
Vận chuyển xuyên màng anion	1,0E-03	9	5,2%	0,2%
Quá trình dị hóa asparagin	1,3E-03	4	2,3%	0,1%
Quá trình sinh sản ở sinh vật đơn bào	2,2E-03	13	7,6%	0,3%
Hình thành nang bào tử	3,6E-03	11	6,4%	0,2%
Phát triển tế bào	3,6E-03	11	6,4%	0,2%
Quá trình chuyển hóa axit amin chứa lưu huỳnh	4,0E-03	8	4,7%	0,2%
Quá trình dị hóa hợp chất nitơ hữu cơ	4,7E-03	11	6,4%	0,2%
Quá trình sinh tổng hợp methionin	5,0E-03	7	4,1%	0,1%
Vận chuyển axit amin	5,4E-03	8	4,7%	0,2%
Ráp thành nang bào tử	5,4E-03	8	4,7%	0,2%
Ráp thành bào tử	5,4E-03	8	4,7%	0,2%
Sự phát sinh thành bào tử	5,4E-03	8	4,7%	0,2%
Sự phát sinh thành nang bào tử	5,4E-03	8	4,7%	0,2%
Quá trình phát triển liên quan đến sự sinh sản	6,1E-03	13	7,6%	0,3%
Quá trình sinh sản sinh vật đơn	6,1E-03	13	7,6%	0,3%
Tạo bào tử hữu tính	6,2E-03	11	6,4%	0,2%
Tạo bào tử hữu tính dẫn đến sự hình thành bào tử của tế bào	6,2E-03	11	6,4%	0,2%
Ráp thành tế bào kiểu nấm	6,3E-03	8	4,7%	0,2%

Ráp thành tế bào	7,3E-03	8	4,7%	0,2%
Quá trình chuyển hóa alpha-axit amin	8,1E-03	14	8,1%	0,3%
Đáp ứng tế bào đối với việc đối nguồn nitơ	9,0E-03	4	2,3%	0,1%
Đáp ứng tế bào đối với các hàm lượng nitơ	9,0E-03	4	2,3%	0,1%
Quá trình chuyển hóa axit amin tế bào	1,1E-02	16	9,3%	0,3%
Vận chuyển axit carboxylic	1,4E-02	9	5,2%	0,2%
Chu trình tế bào của quá trình giảm phân	1,4E-02	15	8,7%	0,3%
Sự phát triển hình dạng cấu trúc giải phẫu	1,5E-02	14	8,1%	0,3%
Sự phát triển cấu trúc giải phẫu	1,5E-02	14	8,1%	0,3%
Quá trình chuyển hóa methionin	1,5E-02	7	4,1%	0,1%
Quá trình chuyển hóa axit amin họ serin	1,5E-02	7	4,1%	0,1%
Vận chuyển axit hữu cơ	1,5E-02	9	5,2%	0,2%
Quá trình chuyển hóa xystein	1,5E-02	5	2,9%	0,1%
Sự phát triển hình dạng thành phần tế bào	1,7E-02	10	5,8%	0,2%
Vận chuyển xuyên màng	1,8E-02	20	11,6%	0,4%
Quá trình phát triển tế bào	1,9E-02	15	8,7%	0,3%
Quá trình chuyển hóa nucleotit nicotinamit	2,5E-02	9	5,2%	0,2%
Quá trình chuyển hóa nucleotit pyridin	2,8E-02	9	5,2%	0,2%
Quá trình chuyển hóa pyruvat	2,8E-02	7	4,1%	0,1%
Quá trình chuyển hóa asparagin	3,2E-02	4	2,3%	0,1%
Vận chuyển hydratcacbon	3,8E-02	7	4,1%	0,1%
Quá trình thủy phân glucoza	3,9E-02	6	3,5%	0,1%
Tạo mới glucoza	4,7E-02	6	3,5%	0,1%

Ngăn tế bào

Thuật ngữ gen	Giá trị p của quá trình làm giàu	Gen được làm giàu	Phần trăm DEG ^a	Phần trăm hệ gen
Màng sinh chất	8,4E-08	28	16,3%	0,5%
Vùng ngoại vi tế bào	6,3E-07	32	18,6%	0,6%
Vùng không gian chất bào được bao quanh bởi thành tế bào	3,0E-03	4	2,3%	0,1%
Màng tế bào	1,7E-02	50	29,1%	1,0%
Vùng không gian chất bào	2,0E-02	4	2,3%	0,1%

Chức năng phân tử

Thuật ngữ gen	Giá trị p của quá trình làm giàu	Gen được làm giàu	Phần trăm DEG ^a	Phần trăm hệ gen
Hoạt tính chất vận chuyển monosacarit xuyên màng	4,4E-06	7	4,1%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển hexoza xuyên màng	4,4E-06	7	4,1%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển đường xuyên màng	3,7E-05	7	4,1%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển đặc hiệu cơ chất	4,0E-05	21	12,2%	0,4%
Hoạt tính chất vận chuyển xuyên màng đặc hiệu cơ chất	7,0E-05	19	11,0%	0,4%
Hoạt tính chất vận chuyển fructoza xuyên màng	8,5E-05	6	3,5%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển mannoza xuyên màng	8,5E-05	6	3,5%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển hydratcacbon xuyên màng	9,9E-05	7	4,1%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển hydratcacbon	9,9E-05	7	4,1%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển glucoza xuyên màng	1,3E-04	6	3,5%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển axit amin xuyên màng	1,8E-04	8	4,7%	0,2%
Hoạt tính chất vận chuyển L-axit amin xuyên	2,1E-04	6	3,5%	0,1%

màng				
Hoạt tính chất vận chuyển axit carboxylic xuyên				
màng	2,7E-04	9	5,2%	0,2%
Hoạt tính chất vận chuyển xuyên màng	4,1E-04	19	11,0%	0,4%
Hoạt tính chất vận chuyển axit hữu cơ xuyên				
màng	4,2E-04	9	5,2%	0,2%
Hoạt tính asparaginaza	4,9E-04	4	2,3%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển	6,8E-04	21	12,2%	0,4%
Hoạt tính chất vận chuyển galactosa xuyên màng	1,4E-03	4	2,3%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển anion hữu cơ xuyên				
màng	1,6E-03	9	5,2%	0,2%
Hoạt tính chất vận chuyển anion xuyên màng	3,1E-03	10	5,8%	0,2%
Hoạt tính chất vận chuyển axit amin trung tính				
xuyên màng	1,2E-02	4	2,3%	0,1%
Hoạt tính hydrolaza, tác động lên liên kết				
cacbon-nitơ (nhưng không phải peptit), trong các				
amit mạch thẳng	1,8E-02	6	3,5%	0,1%
Hoạt tính chất vận chuyển L-prolin xuyên màng	2,8E-02	3	1,7%	0,1%

^a Các gen được biểu hiện khác biệt (Differentially expressed genes)

Chủng AR khác biệt về mặt di truyền với bố mẹ không được tiến hóa thích nghi của chúng

Nguyên tắc cơ bản chi phối sự tiến hóa thích nghi là việc tích lũy các đột biến mà nhìn chung tạo cho sinh vật lợi thế phù hợp trong môi trường đặc biệt. Lựa chọn các chủng AR dựa trên khả năng phân giải theo cách cơ định L-asparagin (Fig.1, 2, 5, và 6), và nhận diện các tập con của các DEG liên quan trong các chủng AR (Fig.7, 8, và 9), các tác giả sáng chế tiếp theo muốn kiểm tra các chủng AR để biệt hóa các đột biến trên toàn hệ gen. Để làm điều này, ADN hệ gen từ mỗi trong số các chủng AR, cũng như bố mẹ, được phân lập và thư viện đọc trình tự ADN được chuẩn bị. Việc đọc trình tự được thực hiện trên nền Illumina MiSeq trong cấu hình ghép cặp đầu cuối 2x300 bp.

Trung bình, thu được 4,05 triệu giá trị đọc cho mỗi chủng tương đương với 2.430 megabazơ và độ bao phủ gấp khoảng 203 lần (giả sử hệ gen đơn bội 12Mb). Dữ liệu đọc trình tự thường có chất lượng rất cao, với 84% điểm Q lớn hơn hoặc bằng 30, và điểm Q trung bình là 35.

Giá trị đọc thô đối với mỗi chủng được làm gọn và lọc chất lượng (điểm Q lớn hơn hoặc bằng 30) trước khi lập bản đồ đối với hệ gen tham chiếu S288C. Trung bình 96,12% giá trị đọc được sắp thẳng thành công. Các giá trị đọc được lập bản đồ được sử

dụng để tạo ra các số liệu thống kê xếp chồng và trình tự liên ứng đối với mỗi bazơ trong hệ gen. Sau đó, thông tin này được so sánh với hệ gen tham chiếu và các đột biến được diễn giải dựa vào trình tự tham chiếu S288C. Cuối cùng, các đột biến đã nhận diện trong các chủng AR được lọc dựa vào các đột biến cũng được nhận diện trong chủng kiểu đại này, để loại bỏ các đột biến thừa. Để tăng độ nhạy thống kê để nhận diện các đột biến, dữ liệu đọc trình tự ARN được tạo ra ban đầu đối với DEG cũng được sử dụng để gọi tên các đột biến. Vì hệ gen của nấm men là xấp xỉ 72% mã hóa, tập hợp dữ liệu ARNseq tạo ra độ phủ tốt đối với khối hệ gen của nấm men.

Các số liệu thống kê tổng kết đối với việc phân tích đột biến được đưa ra trong bảng 10 và 11. Các so sánh chồng lặp đột biến giữa các chủng AR được thể hiện trên Fig.10. Thú vị là, 15.918 trong số 21.047 (75,6%) đột biến là chung với cả ba chủng, trong khi 17.571 (83,5%) là chung với ít nhất hai trong số các chủng AR (Fig.10).

ADN hệ gen được thu từ chủng kiểu đại và các chủng nấm men AR (RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03). Thư viện đọc trình tự ADN (Nextera XT)—thu được từ ADN hệ gen—được đọc trình tự trên nền Illumina MiSeq trong cấu hình ghép cặp đầu cuối 2x300 bp. Các giá trị đọc ban đầu được lọc về chất lượng và được lập bản đồ đối với hệ gen tham chiếu S288C. Các chồng giá trị đọc được sử dụng để gọi tên các biến thể ở mỗi nucleotit so với trình tự liên ứng S288C. Các biến thể ở các chủng nấm men AR được lọc dựa vào các biến thể kiểu đại để loại bỏ đột biến thừa. Xem bảng 10.

Bảng 10: Tổng kết các đột biến tổng cộng được nhận diện trong tập hợp dữ liệu đọc trình tự ADN và đọc trình tự ARN.

	Kiểu đại	RBAR-01	RBAR-02	RBAR-03
Đọc trình tự ARN				
Các đột biến đã nhận diện	58.071	52.324	53.096	52.323
Kiểu đại được lọc	--	3.728	4.098	3.778
Đọc trình tự ADN				
Các đột biến đã nhận diện	58.071	69.567	69.261	68.979
Kiểu đại được lọc	--	17.435	17.190	17.223
Các đột biến kết hợp	--	18.355	18.136	18.045
ARNseq đặc trưng	--	920	946	822
ADNseq đặc trưng	--	14.627	14.038	14.267
ARN/ADN seq chung	--	2.808	3.152	2.956

Bảng 11 | Sự phá vỡ các kiểu đột biến trong chủng AR. Các đột biến được nhận diện trong bảng 10 được phân loại theo kiểu của chúng.

	RBAR-01	RBAR-02	RBAR-03
Tổng các đột biến đặc trưng	18.355	18.136	18.045
Các đột biến không mã hóa	10.820	10.619	10.690
Đột biến gen khởi đầu ^a	8.378	8.249	8.281
TFBS ^b	4.894	4.792	4.862
Không TFBS	3.484	3.457	3.419
Các đột biến khác gen	2.442	2.370	2.409
Đột biến exon	9.205	9.130	9.028
SNV ^c đồng nghĩa	5.630	5.598	5.540
SNV không đồng nghĩa	2.975	2.939	2.928
Cài xen xê dịch khung	131	136	126
Xóa xê dịch khung	86	77	77
Thay thế xê dịch khung	21	16	12
Cài xen không xê dịch khung	176	188	163
Xóa không xê dịch khung	98	102	99
Thay thế không xê dịch khung	36	30	31
Điểm dừng đạt	45	38	46
Điểm dừng mất	7	6	6

^a Gen khởi đầu được xác định bởi vị trí -1000 đến -1 so với vị trí bắt đầu phiên mã

^b Vị trí liên kết yếu tố phiên mã (Transcription factor binding site)

^c Biến thể nucleotit đơn (Single nucleotit variant)

Căn cứ vào việc gây đột biến ngẫu nhiên và tiến hóa thích nghi là các phương pháp không được nhắm đích, dường như là phần lớn các đột biến được nhận diện trong các chủng AR là không cần thiết đối với kiểu hình AR, tức là, sự biểu hiện cơ định của *ASP3* và sự phân hủy của L-asparagin. Do đó, vị trí thích hợp nhất cho các đột biến quyết định xảy ra là trong vùng ghi mã của các gen liên quan hoặc gen khởi đầu của các gen đã nêu. Quan trọng là, để các đột biến vùng ghi mã tác động đến chức năng protein, chúng phải ảnh hưởng đến cấu trúc protein tức là trình tự. Tương tự, để các đột biến vùng gen khởi đầu tác động đến sự biểu hiện gen, dường như là chúng phải xảy ra trong vị trí liên kết yếu tố phiên mã (TFBS). Như vậy, cả các biến thể nucleotit đơn vùng ngoài cùng nghĩa (SNV), cũng như các đột biến gen khởi đầu khác gen và không phải TFBS có thể được lọc ra. Cùng nhau, các tiêu chuẩn lọc này để lại 8.469 đột biến ứng viên (4.894 TFBS và 3.575 vùng ngoài), 8.324 (4.792 TFBS và 3.532 vùng ngoài), và 8.350 (4.862 TFBS và 3.488 vùng ngoài) trong RBAR-01, RBAR-02

và RBAR-03, một cách tương ứng. Do đó, rõ ràng là sự tiến hóa thích nghi của các chủng AR dẫn đến sự thay đổi trình tự ADN của các chủng, nhờ đó cho phép chúng khắc phục được sự ức chế *ASP3* bởi NCR và phân giải theo cách cơ định L-asparagin.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành acrylamit ở bánh mì và bánh mì nướng

Acrylamit tạo thành trong bánh mì khi asparagin tự do phản ứng với các đường khử ở nhiệt độ cao hơn 120°C. Quan trọng là, các đường khử trong bánh mì xuất hiện với lượng dư so với asparagin; do đó, mức AA trong bánh mì có tương quan cao so với hàm lượng asparagin (26, 67-69). Hơn thế nữa, đã chứng minh được rằng mức AA trong bánh mì tăng đáng kể trong quá trình nướng bánh mì, khi asparagin chưa được phản ứng trên phần bên trong của các ổ bánh mì được tiếp xúc với nhiệt độ cao (21). Do đó, việc loại bỏ asparagin trong toàn bộ ổ bánh mì trước khi nướng bánh mì là yếu tố quan trọng để làm giảm toàn bộ AA tiềm năng của bánh mì.

Sau khi chứng minh được rằng các chủng nấm men AR biểu hiện cơ định *ASP3* và phân giải L-asparagin (Fig. 2, 5, và 6), tiếp theo các tác giả sáng chế muốn xác định xem liệu các chủng này có thể được sử dụng để làm giảm AA trong bánh mì hay không. Để thực hiện việc này, bánh mì từ bột mì trắng và nguyên cám được tạo ra với nấm men kiểu dại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03, và mức AA được phân tích ở cả bánh mì bỏ lò và bánh mì nướng (Fig.11). Trong tất cả các bánh mì được sản xuất với nấm men kiểu dại, mức AA nằm trong khoảng 30-67 ppb. Trái lại, tất cả các bánh mì được sản xuất với các chủng nấm men AR có mức AA gần như không phát hiện được (< 10 ppb), tương đương với sự giảm AA trung bình xấp xỉ bằng 80%. Phù hợp với tác động của việc gia nhiệt đến mức AA, mối tương quan dương rõ ràng được quan sát thấy giữa việc nướng bánh mì và mức AA trong tất cả các bánh mì được sản xuất bởi tất cả các chủng. Tính trung bình, việc nướng bánh mì ở nhiệt độ thấp, trung bình và cao làm tăng AA gấp 3, 5, và 7 lần, một cách tương ứng (Fig.11). Tuy nhiên, trong bánh mì nướng được sản xuất với các chủng AR, mức AA thấp hơn đáng kể, với sự giảm AA trung bình bằng 75-85%. Trong hầu hết các trường hợp, mức AA trong bánh mì nướng được sản xuất bởi các chủng AR thấp hơn so với bánh mì không được nướng được sản xuất bởi chủng kiểu dại (Fig.10). Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này là đại diện của nhiều hơn 10 thử nghiệm độc lập. Cùng nhau, các kết quả này xác nhận các chủng nấm men AR là phương pháp mạnh và liền một mối để làm giảm mức AA trong bánh mì và bánh mì nướng.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành acrylamit ở khoai tây chiên

Vì thực phẩm gốc khoai tây giàu cả asparagin và các đường khử, chúng có xu hướng chứa một số mức AA (12) cao nhất. Do đó, sau khi đã chứng minh được rằng các chủng nấm men AR biểu hiện cơ định *ASP3* và phân giải L-asparagin (Fig. 2, 5, và 6), cũng như khả năng của chúng để làm giảm đáng kể mức AA trong bánh mì và bánh mì nướng (Fig.11), tiếp theo các tác giả sáng chế tiến hành xác định xem liệu các chủng này có thể được sử dụng để làm giảm AA trong khoai tây chiên hay không. Mặc dù nấm men không phải là thành phần trong khoai tây chiên, bước ngâm trong nước thường phổ biến đối với quá trình sản xuất chúng. Do đó, giả thuyết rằng việc ngâm khoai tây trong hỗn hợp nước/nấm men trước khi rán có thể làm giảm AA trong khoai tây chiên—trong thời gian này nấm men sẽ phân giải asparagin trên bề mặt của khoai tây, nhờ đó làm giảm AA.

Để kiểm tra giả thuyết này, mức AA được phân tích ở khoai tây chiên được chế biến từ khoai tây Russet tươi chỉ được ngâm trong nước, hoặc trong dung dịch nước/nấm men của nấm men kiểu đại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03 (Fig.12). Phù hợp với hàm lượng đường và asparagin cao của chúng, khoai tây chiên đối chứng không có nấm men có mức AA cao—440 ppb. Trái lại, tất cả các chủng nấm men AR đều có khả năng làm giảm đáng kể hàm lượng AA của khoai tây chiên (sự giảm trung bình 71% – 127 ppb), trong đó RBAR-03 làm giảm 77% (100 ppb). Đáng quan tâm là, chủng nấm men kiểu đại có khả năng làm giảm AA ở khoai tây chiên 55% (200 ppb), so với đối chứng không có nấm men. Điều này dường như là do khả năng tự nhiên của nấm men để lên men đường. Trên thực tế, trong hầu hết các thực phẩm bị ảnh hưởng bởi AA tức là thực phẩm không có nguồn gốc từ khoai tây, asparagin là chất phản ứng giới hạn cho sự tạo thành AA. Tuy nhiên, ở khoai tây, asparagin và các đường khử có mặt với lượng gần bằng mol (70)—do đó, việc giới hạn đường khử là biện pháp giảm AA hiệu quả cho khoai tây. Tuy nhiên, mức đường khử và asparagin được biết là thay đổi tùy thuộc vào giống khoai tây, mùa, và điều kiện bảo quản (70). Do đó, hiệu quả của nấm men kiểu đại—mà có thể chỉ tiêu thụ đường và chỉ trong các điều kiện xử lý thuận lợi, ví dụ, thời gian tiếp xúc đủ—để làm giảm acrylamit trong sản phẩm khoai tây sẽ thay đổi. Như vậy, các chủng nấm men AR, với khả năng phân giải asparagin của chúng, có khả năng làm giảm đáng kể và phù hợp mức AA hơn quá trình lên men đường đơn giản.

Để kiểm tra tiếp nấm men AR trong thời gian tiếp xúc tương đối ngắn và điều kiện nhiệt độ cao, các tác giả sáng chế đã chuẩn bị khoai tây cắt lát như được mô tả trên đây và ngâm chúng trong nước hoặc hỗn hợp nước/nấm men AR (chỉ có RBAR-03) trong 50 giây ở nhiệt độ 68°C. Như được thể hiện trên Fig.13, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy mối quan hệ phụ thuộc liều lượng giữa lượng nấm men AR được sử dụng và quan sát thấy sự giảm acrylamit. Trong các điều kiện được thử nghiệm, nồng độ thấp nhất của nấm men AR (100 g/L) có khả năng làm giảm acrylamit 19% (1002 ppb so với 1240 ppb). Tuy nhiên, ở nồng độ 250 g/L đối với nấm men AR, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy sự giảm acrylamit đáng kể là 49% (632 ppb so với 1240 ppb). Đáng quan tâm là, các tác giả sáng chế không quan sát thấy lợi ích đáng kể bất kỳ đối với việc sử dụng nấm men AR 300 g/L, gợi ý rằng mức giảm acrylamit tối đa có thể là 50% trong các điều kiện được thử nghiệm. Tuy nhiên, trong các điều kiện khác được tối ưu hóa hơn, sự giảm acrylamit bởi nấm men AR có thể cao hơn đáng kể. Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này đại diện cho nhiều thử nghiệm độc lập. Cùng nhau, các dữ liệu này chỉ ra rằng nấm men AR có hiệu quả làm giảm AA ở khoai tây chiên, và nói một cách rộng hơn, thực phẩm đã được chiên chế biến từ khoai tây tươi.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành acrylamit ở viên đồ ăn nhẹ

Đã chứng tỏ được tính hữu dụng của các chủng AR để làm giảm AA ở sản phẩm khoai tây tươi (Fig.14), hiệu quả của chúng tiếp theo được thử nghiệm ở thực phẩm dạng đồ ăn nhẹ có nguồn gốc từ bột khoai tây. Để tiến hành điều này, sản phẩm đồ ăn nhẹ có nguồn gốc từ khoai tây đã được ép dẹt và chiên được chế biến với nấm men kiểu đại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03, và mức asparagin trong quá trình xử lý được phân tích —mức AA cũng được xác định trong sản phẩm đã được chiên cuối cùng (Fig.14). Đối với asparagin, so với đối chứng không có nấm men hoặc nấm men kiểu đại, tất cả các chủng AR đều có khả năng phân hủy asparagin (Fig.14A). Cụ thể hơn, RBAR-01 và RBAR-03 tiêu thụ toàn bộ asparagin trong viên đồ ăn nhẹ trong thời gian xử lý ngắn, chẳng hạn như 30 phút. Trái lại, hoạt tính phân hủy asparagin trong RBAR-02 ít mạnh hơn trong mẫu thực phẩm này —sự giảm 45% trong 60 phút. Tuy nhiên, hoạt tính này rõ ràng hơn, so với đối chứng không có nấm men hoặc nấm men kiểu đại.

Đối với sự giảm AA, tất cả các chủng AR là hiệu quả. Tính trung bình, các chủng AR làm giảm AA 75% (trung bình 100 ppb so với 400 ppb – Fig.14B). Phù hợp

với khả năng tốt hơn đã được chứng tỏ của chúng để phân giải asparagin trong mẫu thức ăn này, RBAR-01 và RBAR-03 tạo ra mức AA thấp nhất —giảm 82 và 85% (70 và 60 ppb), một cách tương ứng (Fig.14B). Đáng quan tâm là, và trái với trường hợp khoai tây chiên, nấm men kiểu đại không có khả năng làm giảm mức AA trong viên đồ ăn nhẹ. Điều này dường như là do sự có mặt của các thành phần không chứa asparagin trong hỗn hợp viên đồ ăn nhẹ (tinh bột khoai tây và maltodextrin). Các thành phần này làm tăng đáng kể hàm lượng đường khử của hỗn hợp, nhờ đó làm cho asparagin là chất phản ứng giới hạn đối với sự tạo thành AA trong viên đồ ăn nhẹ. Như vậy, hoạt tính lên men đường của nấm men là không hiệu quả để làm giảm AA. Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này đại diện cho nhiều thử nghiệm độc lập. Nói chung, các dữ liệu này xác nhận rằng nấm men AR có thể được sử dụng thành công để làm giảm AA ở thực phẩm có nguồn gốc từ bột khoai tây đã được ép dẹt, chiên.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành acrylamit ở bánh quy ngọt

Đã chứng tỏ được tính hữu dụng của các chủng AR để làm giảm AA ở bánh mì và bánh mì nướng, sản phẩm khoai tây tươi, và sản phẩm khoai tây đã được chế biến (Fig. 11, 12, 13 và 14), hiệu quả của chúng tiếp theo được thử nghiệm ở bánh quy ngọt.

Để thực hiện điều này, sản phẩm bánh quy ngọt được tạo ra với nấm men kiểu đại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03, và được phân tích mức AA trong sản phẩm đã được chiên cuối cùng (Fig.15). So với đối chứng không có nấm men, tất cả các chủng AR đều có khả năng làm giảm mức AA trong sản phẩm cuối cùng (sự giảm trung bình 69% - trung bình 103 ppb so với 330 ppb), trong đó RBAR-03 là hiệu quả nhất (giảm 79% – 70 ppb so với 330 ppb). Tương tự trường hợp với khoai tây chiên (Fig.12), lưu ý rằng nấm men kiểu đại có khả năng làm giảm AA đến một số mức độ nhất định (giảm 30% - 230 ppb so với 330 ppb), mà dường như là do hoạt tính lên men. Tuy nhiên, các chủng AR có khả năng làm giảm AA được tăng cường do khả năng phân giải asparagin của chúng. Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này đại diện cho nhiều thử nghiệm độc lập. Nói chung, các dữ liệu này chỉ ra rằng nấm men AR có hiệu quả làm giảm AA ở bánh quy ngọt.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành acrylamit ở bánh mì xoắn

Đã chứng tỏ được tính hữu dụng của các chủng AR để làm giảm AA ở bánh mì và bánh mì nướng, sản phẩm khoai tây tươi, sản phẩm khoai tây đã được chế biến, và bánh quy ngọt (Fig. 11, 12, 13, 14, và 15), hiệu quả của chúng được thử nghiệm ở bánh mì xoắn. Bánh mì xoắn thường chứa mức AA cao do quy trình rửa natri hydroxit được sử dụng để làm tăng sự nhuộm nâu trong quá trình sản xuất—trên thực tế, sự tạo thành AA được tăng tốc ở độ pH cao.

Bánh mì xoắn được tạo ra với nấm men kiểu đại hoặc các chủng AR RBAR-01, RBAR-02 và RBAR-03, và mức AA được phân tích trong sản phẩm cuối cùng (Fig.16). So với nấm men kiểu đại, tất cả các chủng AR cực kỳ có khả năng làm giảm mức AA trong sản phẩm cuối cùng (sự giảm trung bình 98% - trung bình < 5 ppb so với 200 ppb). Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này đại diện cho nhiều thử nghiệm độc lập. Nói chung, các dữ liệu này chỉ ra rằng nấm men AR rất có khả năng làm giảm AA ở bánh mì xoắn.

Chủng AR làm giảm sự tạo thành asparagin và acrylamit ở cà phê

Đã chứng tỏ được tính hữu dụng của các chủng AR để làm giảm AA ở bánh mì và bánh mì nướng, sản phẩm khoai tây tươi, sản phẩm khoai tây đã được chế biến, bánh quy ngọt, và bánh mì xoắn (Fig. 11, 12, 13, 14, 15, và 16), hiệu quả của chúng được thử nghiệm trong cà phê. Trong phép chứng minh khái niệm thứ nhất, chủng nấm men kiểu đại và chủng nấm men AR RBAR-03 được thử nghiệm trong quá trình lên men hạt cà phê xanh đã xay (Fig.17). So với đối chứng không có nấm men, chủng kiểu đại này làm giảm AA 52% (191 ppb so với 394 ppb), có lẽ là do sự lên men của các đường khử ở hạt đậu. Tuy nhiên, chủng AR RBAR-03, với khả năng của nó để làm giảm cả đường và asparagin, làm giảm AA 92% (32 ppb so với 394 ppb).

Căn cứ vào việc chủng AR có khả năng làm giảm AA khi được áp dụng trực tiếp cho hạt cà phê xanh đã xay (Fig.17), khả năng của nấm men AR để làm giảm asparagin tiếp theo được thử nghiệm ở dịch chiết cà phê xanh trong nước. Các dịch chiết này, khi được làm nghèo các hợp chất đang quan tâm, ví dụ, asparagin hoặc caffein, có thể được sử dụng để loại bỏ chọn lọc hợp chất đó khỏi hạt cà phê xanh trước khi rang. Nếu asparagin được loại bỏ theo cách này, AA sẽ được làm giảm trong cà phê đã rang thu được.

Như được thể hiện trên Fig.18, nấm men AR (RBAR-03) có khả năng làm giảm L-Asparagin trong GCE (18% chất rắn) theo cách phụ thuộc thời gian và nồng độ. Ở nồng độ cao nhất của nấm men AR (10^9 tế bào/mL), lớn hơn 95% L-Asparagin được tiêu thụ trong 30 phút (340 g/100g L-Asparagin, thời gian = 0 so với 13,1 g/100g L-Asparagin, thời gian = 30 phút), trong khi ở nồng độ trung bình (10^8 tế bào/mL), điều này đạt được trong vòng 90 phút (340 g/100g L-Asparagin, thời gian = 0 so với 10,5 g/100g L-Asparagin, thời gian = 30 phút). Ở nồng độ thấp nhất của nấm men AR (10^7 tế bào/mL), sự tiêu thụ L-Asparagin là không hoàn toàn, trong đó chỉ có sự giảm 43% tại thời điểm 150 phút (340 g/100g L-Asparagin, thời gian = 0 so với 195 g/100g L-Asparagin, thời gian = 150 phút). Lưu ý là, các kết quả và điều kiện này đại diện cho nhiều thử nghiệm độc lập. Cùng nhau, các dữ liệu này xác nhận rằng các chủng AR—mà có khả năng phân giải L-Asparagin—có khả năng làm giảm hiệu quả L-Asparagin và AA trong cà phê.

Kết luận

Mặc dù có nhu cầu rõ ràng đối với các công cụ làm giảm AA tốt hơn, các phương pháp hiện có không có hiệu quả đủ cao, hoặc khó thực hiện về mặt kỹ thuật, về mặt hậu cần, và về mặt tài chính. Để khắc phục vấn đề này, công nghệ làm giảm AA mới dựa trên men bánh mỳ đã được phát triển. Việc sử dụng nấm men để điều khiển sự giảm AA trong thực phẩm là giải pháp lý tưởng vì 1) nó vốn là thành phần thực phẩm tự nhiên mà con người đã có lịch sử lâu dài tiếp xúc với nó; 2) nấm men được US FDA đánh giá là ‘được chứng nhận là an toàn’ (GRAS) hoặc các đánh giá tương đương ở hầu hết các quốc gia trên thế giới; 3) nấm men vốn là thành phần chính trong nhiều thực phẩm mà AA là vấn đề đáng kể đối với các thực phẩm này ví dụ, bánh mỳ; 4) nấm men AR có thể được đưa vào dưới dạng sự xử lý tạm thời đối với các thực phẩm khác mà AA là vấn đề đối với các thực phẩm này ví dụ, sản phẩm khoai tây, ngũ cốc, thực phẩm dạng đồ ăn nhẹ và cà phê; 5) nấm men tốn ít chi phí để sinh trưởng và dễ xử lý và 6) hầu hết các nhà sản xuất thực phẩm trên thị trường đều đã có sẵn kinh nghiệm xử lý nấm men. Hơn thế nữa, được tiến hóa thích nghi từ chủng men bánh mỳ, các chủng nấm men AR có thể thay thế nguyên và dễ dàng men bánh mỳ trong tất cả các quy trình nướng bánh hiện có vì không cần phải thay đổi các quy trình nướng bánh công nghiệp để sử dụng nấm men AR, để sản xuất bánh mỳ hoặc sản phẩm nướng được lên men bằng nấm men bất kỳ.

Như được mô tả trong báo cáo này, các chủng nấm men bánh mỳ AR không được cải biến di truyền, được tiến hóa thích nghi—mà biểu hiện cơ định asparaginaza gắn thành tế bào II *ASP3* (Fig. 2, 5, và 6)—là giải pháp mạnh và có hiệu quả cao để giải quyết vấn đề AA trong thực phẩm. Các chủng nấm men AR có khả năng làm giảm đáng kể mức asparagin trong nhiều thực phẩm khác nhau lên đến 95 % với thời gian tiếp xúc và sự thay đổi trong quá trình xử lý ở mức tối thiểu (Fig. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, và 18)—trong thực phẩm trong đó nấm men vốn là một thành phần, không cần sự thay đổi trong quá trình xử lý.

Nhờ phân hủy đáng kể asparagin trong thực phẩm trước khi nấu, công nghệ này ngăn ngừa sự tạo thành AA bất kể thực tiễn xử lý thực phẩm tiếp theo, tức là, chủng AR làm giảm AA tiềm tàng của thực phẩm. Điều này hạn chế nhu cầu đối với phương pháp làm giảm và kiểm soát AA đa hướng —bao gồm phạm vi lớn các thông số và thể hiện sự can thiệp quy mô rộng—mà khó thực hiện về mặt hậu cần và kỹ thuật, cực kỳ tốn chi phí, và khó kiểm soát (ví dụ, chuẩn bị thức ăn trong gia đình và nhà hàng).

Tóm lại, phương pháp gây tiến hóa thích nghi được sử dụng để phát triển các chủng nấm men bánh mỳ mới, không GMO biểu hiện cơ định asparaginaza gắn thành tế bào II (*ASP3*) và phân giải L-asparagin để làm giảm mức AA trong nhiều loại thực phẩm thông thường. Các chủng AR có khả năng làm giảm mức AA trong bánh mỳ và các thực phẩm lên men bởi nấm men khác, thực phẩm có nguồn gốc từ khoai tây, thực phẩm dạng đồ ăn nhẹ đã được ép đùn, bánh quy ngọt, bánh mỳ xoắn, và cà phê xuống 95 %.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả dựa vào các ví dụ, nhưng cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ đã được bộc lộ. Trái lại, sáng chế được dự định bao gồm các cải biến khác và các dạng tương đương được bao gồm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Tất cả các tài liệu công bố, patent và đơn yêu cầu cấp patent đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tài liệu tham khảo

1. Besaratinia A, Pfeifer GP. 2007. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis* 28:519–528.
2. Exon JH. 2006. A Review of the Toxicology of Acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 9:397–412.
3. Capuano E, Fogliano V. 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology* 44:793–810.
4. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C. 2006. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:481–608.
5. Besaratinia A, Pfeifer GP. 2004. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J. Natl. Cancer Inst* 96:1023–1029.
6. Rice JM. 2005. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 580:3–20.
7. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419:448–449.
8. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA. 2002. Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419:449–450.
9. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. 2002. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4998–5006.
10. Normandin L, Bouchard M, Ayotte P, Blanchet C, Becalski A, Bonvalot Y, Phaneuf D, Lapointe C, Gagné M, Courteau M. 2013. Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology* 57:75–83.
11. Chen Y-H, Xia E-Q, Xu X-R, Ling W-H, Li S, Wu S, Deng G-F, Zou Z-F, Zhou J, Li H-B. 2012. Evaluation of Acrylamide in Food from China by a LC/MS/MS

Method. IJERPH 9:4150–4158.

12. Wenzl T, Ankla E. 2007. European Union database of acrylamide levels in food: Update and critical review of data collection. *Food Additives and Contaminants* 24:5–12.
13. Mojska H, Gielecińska I, Szponar L, Ołtarzewski M. 2010. Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology* 48:2090–2096.
14. Tran NL, Barraj LM, Murphy MM, Bi X. 2010. Dietary Acrylamide Exposure and Hemoglobin Adducts “ National Health and Nutrition Examination Survey (2003–04). *Food and Chemical Toxicology* 48:3098–3108.
15. Sirot VR, Hommet F, Tard A, Leblanc J-C. 2012. Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology* 50:889–894.
16. Zhou PP, Zhao YF, Liu HL, Ma YJ, Li XW, Yang X, Wu YN. 2013. Dietary exposure of the Chinese population to acrylamide. *Biomed. Environ. Sci.* 26:421–429.
17. Mojska H, Gielecińska I, Stoś K. 2012. Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an assessment of infant dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology* 50:2722–2728.
18. Cengiz MF, Gündüz CPB. 2013. Acrylamide exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based baby food samples. *Food and Chemical Toxicology* 60:514–519.
19. Bent G-A, Maragh P, Dasgupta T. 2012. Acrylamide in Caribbean foods “ Residual levels and their relation to reducing sugar and asparagine content. *Food Chemistry* 133:451–457.
20. Pelucchi C, Bosetti C, Galeone C, La Vecchia C. 2014. Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *Int. J. Cancer* 136:2912–2922.
21. Jackson LS, Al-Taher F. 2005. Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 561:447–465.
22. Fredriksson H, Tallving J, Rosén J, Åman P. 2004. Fermentation reduces free

asparagine in dough and acrylamide content in bread. *Cereal Chemistry* 81:650–653.

23. Bråthen E, Kita A, Knutsen SH, Wicklund T. 2005. Addition of Glycine Reduces the Content of Acrylamide in Cereal and Potato Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3259–3264.
24. Fink M, Andersson R, Rosén J, Åman P. 2006. Effect of Added Asparagine and Glycine on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Bread. *Cereal Chemistry* 83:218–222.
25. Gökmen V, Palazoğlu TK. 2007. Acrylamide Formation in Foods during Thermal Processing with a Focus on Frying. *Food Bioprocess Technol* 1:35–42.
26. Amrein TM, Schönbächler B, Escher F, Amadò R. 2004. Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4282–4288.
27. Claus A, Schreiter P, Weber A, Graeff S, Herrmann W, Claupein W, Schieber A, Carle R. 2006. Influence of Agronomic Factors and Extraction Rate on the Acrylamide Contents in Yeast-Leavened Breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8968–8976.
28. Claus A, Mongili M, Weisz G, Schieber A, Carle R. 2008. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science* 47:546–554.
29. Chawla R, Shakya R, Rommens CM. 2012. Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnology Journal* 10:913–924.
30. Ye J, Shakya R, Shrestha P, Rommens CM. 2010. Tuber-Specific Silencing of the Acid Invertase Gene Substantially Lowers the Acrylamide-Forming Potential of Potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12162–12167.
31. Rommens CM, Yan H, Swords K, Richael C, Ye J. 2008. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal* 6:843–853.
32. Cooper TG. 1982. Nitrogen metabolism in *S. cerevisiae*, pp. 39–99. *In* J.N. Strathern, EWJ (ed.), *The molecular biology of the yeast: metabolism and gene*

expression. Cold Spring Harbor Press, New York.

33. Jones GE. 1977. Genetic and physiological relationships between L-asparaginase I and asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 130:128–130.
34. League GP, Slot JC, Rokas A. 2012. The ASP3 locus in *Saccharomyces cerevisiae* originated by horizontal gene transfer from *Wickerhamomyces*. *FEMS Yeast Research* 12:859–863.
35. Sinclair K, Warner JP, Bonthron DT. 1994. The ASP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. *Gene* 144:37–43.
36. Kim KW, Kamerud JQ, Livingston DM, Roon RJ. 1988. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *Journal of Biological Chemistry* 263:11948–11953.
37. Dunlop PC, Meyer GM, Roon RJ. 1980. Nitrogen catabolite repression of asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 143:422–426.
38. Huang Y-C, Chen H-T, Teng S-C. 2010. Intragenic transcription of a noncoding RNA modulates expression of ASP3 in budding yeast. *RNA (New York, N.Y.)* 16:2085–2093.
39. Pauling KD, Jones GE. 1980. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: Dynamics of Accumulation and Loss in Rapidly Growing Cells. *J. Gen. Microbiol.* 117:423–430.
40. Roon RJ, Murdoch M, Kunze B, Dunlop PC. 1982. Derepression of asparaginase II during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ammonium ion. *Arch. Biochem. Biophys.* 219:101–109.
41. Ferrara MA, Mattoso JMV, Bon EPS, Pereira N. 2004. Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2dal80 mutant: effect of nitrogen nutrition and pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116:299–305.
42. Hofman-Bang J. 1999. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biotechnology* 12:35–73.
43. Derkx PM, Janzen T, Sørensen KI, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Johansen

- E. 2014. The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. *Microb. Cell Fact.* 13:S5.
44. Pedersen MB, Iversen SL, Sørensen KI, Johansen E. 2005. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 29:611–624.
45. Margolles A, Sanchez B. 2012. Selection of a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain with a Decreased Ability To Produce Acetic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 78:3338–3342.
46. Saarela M, Alakomi HL, Mättö J, Ahonen AM, Puhakka A, Tynkkynen S. 2011. Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology* 149:106–110.
47. Smith J, van Rensburg E, Görgens JF. 2014. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnol.* 14:41.
48. Bachmann H, Starrenburg MJC, Molenaar D, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JET. 2012. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome research* 22:115–124.
49. guez JOV-R, Shi S, Siewers V, Nielsen J. 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non-essential fatty acid utilization pathways. *APPLIED ENERGY* 115:226–232.
50. Callanan MJ, Beresford TP, Ross RP. 2005. Genetic Diversity in the Lactose Operons of *Lactobacillus helveticus* Strains and Its Relationship to the Role of These Strains as Commercial Starter Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1655–1658.
51. Çakar ZP, Turanlı-Yıldız B, Alkım C, Yılmaz Ü. 2011. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Res* 12:171–182.
52. Winkler JD, Kao KC. 2014. Recent advances in the evolutionary engineering of

industrial biocatalysts. *Genomics* 104:406–411.

53. Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA. 2009. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37:139–149.
54. Liu E, Hu Y. 2010. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochemical Engineering Journal* 48:204–210.
55. Stroman P, Muller CC, Sorensen KI. 2003. Heat Shock Treatment Increases the Frequency of Loss of an Erythromycin Resistance-Encoding Transposable Element from the Chromosome of *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7173–7180.
56. Dragosits M, Mattanovich D. 2013. Adaptive laboratory evolution  principles and applications for biotechnology. *Microb. Cell Fact.* 12:1–1.
57. Gresham D, Usaite R, Germann SM, Lisby M, Botstein D, Regenbreg B. 2010. Adaptation to diverse nitrogen-limited environments by deletion or extrachromosomal element formation of the GAP1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18551–18556.
58. Hong J, Gresham D. 2014. Molecular Specificity, Convergence and Constraint Shape Adaptive Evolution in Nutrient-Poor Environments. *PLoS genetics* 10:e1004041–16.
59. WATANABE T, IEFUJI H, KITAMOTO HK. 2013. Genome-wide screening to study breeding methods to improve the nitrogen accumulation ability of yeast without gene recombinant techniques. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77:917–922.
60. Kamerud JQ, Roon RJ. 1986. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: selection of four mutations that cause derepressed enzyme synthesis. *Journal of Bacteriology* 165:293–296.
61. Tristezza M, Gerardi C, Logrieco A, Grieco F. 2009. An optimized protocol for

the production of interdelta markers in *Saccharomyces cerevisiae* by using capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 78:286–291.

62. Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267–272.

63. Köhrer K, Domdey H. 1991. Preparation of high molecular weight RNA. *Methods in enzymology* 194:398–405.

64. Dunlop PC, Roon RJ, Even HL. 1976. Utilization of D-asparagine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 125:999–1004.

65. Roon RJ, Even HL, Dunlop P, Larimore FL. 1975. Methylamine and ammonia transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 122:502–509.

66. Roon RJ, Levy JS, Larimore F. 1977. Negative interactions between amino acid and methylamine/ammonia transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 252:3599–3604.

67. Keramat J, LeBail A, Prost C, Jafari M. 2010. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioprocess Technol* 4:530–543.

68. Capuano E, Ferrigno A, Acampa I, Serpen A, Açar ÖÇ, Gökmen V, Fogliano V. 2009. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *FRIN* 42:1295–1302.

69. Surdyk N, Rosén J, Andersson R, Åman P. 2004. Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2047–2051.

70. Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, Postles J, Elmore JS, Mottram DS. 2012. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of Experimental Botany* 63:2841–2851.

71. Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190:885–929.

International Depositary Authority of Canada**APPENDIX A**

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

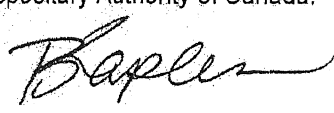
Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT(issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty Regulations*)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

I. Depositor	
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	
II. Identification of the Deposit	
Identification reference given by the depositor: RBAR-01	Accession number assigned by this International Depositary Authority: 140515-01
III. Scientific Description and/or Proposed Taxonomic Designation	
The deposit identified under II above was accompanied by: ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (mark with a cross where applicable)	
IV. Receipt and Acceptance	
This International Depositary Authority accepts the deposit identified under II above, which was received by it on May 14th, 2015 (Date of the original deposit).	
V. International Depositary Authority of Canada:	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: May 21st, 2015

International Depositary Authority of Canada

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

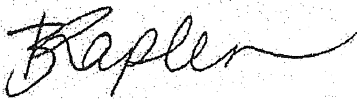
Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
(issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty* Regulations)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

I. Depositor	
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp.	
Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	
II. Identification of the Deposit	
Identification reference given by the depositor: RBAR-02	Accession number assigned by this International Depositary Authority: 140515-02
III. Scientific Description and/or Proposed Taxonomic Designation	
The deposit identified under II above was accompanied by: ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (mark with a cross where applicable)	
IV. Receipt and Acceptance	
This International Depositary Authority accepts the deposit identified under II above, which was received by it on May 14th, 2015 (Date of the original deposit).	
V. International Depositary Authority of Canada:	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: May 21st, 2015

Receipt in the Case of an Original Deposit 1/1

File #: 173 (15)

International Depositary Authority of Canada

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
(issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty* Regulations)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

I. Depositor	
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp. Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	
II. Identification of the Deposit	
Identification reference given by the depositor: RBAR-03	Accession number assigned by this International Depositary Authority: 140515-03
III. Scientific Description and/or Proposed Taxonomic Designation	
The deposit identified under II above was accompanied by: ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (mark with a cross where applicable)	
IV. Receipt and Acceptance	
This International Depositary Authority accepts the deposit identified under II above, which was received by it on May 14th, 2015 (Date of the original deposit).	
V. International Depositary Authority of Canada:	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: May 21st, 2015

International Depositary Authority of Canada

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty* Regulations)

I. Party to Whom This Viability Statement is Issued	
Name: Melanie Szweras Bereskin & Parr LLP	Address: Scotia Plaza 40 King Street West, 40th floor Toronto, ON M5H 3Y2
II. Depositor	III. Identification of the Deposit
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	Accession number given by IDAC: 140515-01 Date of the deposit or of the transfer ¹ : May 14th, 2015
IV. Viability Statement	
The viability of the deposit identified above was tested on (most recent test date): June 1st, 2015 On that date, the deposit was ☒ Viable ☐ No longer viable	
V. Conditions Under Which the Viability Test has Been Performed ²	
VI. International Depositary Authority of Canada	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: June 1st, 2015 

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer)² To be filled in if the information has been requested and if the results of the test are negative.

Statement of Viability 1/1

File #: 173 (15)

International Depositary Authority of Canada

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty* Regulations)

I. Party to Whom This Viability Statement is Issued	
Name: Melanie Szweras Bereskin & Parr LLP	Address: Scotia Plaza 40 King Street West, 40th floor Toronto, ON M5H 3Y2
II. Depositor	III. Identification of the Deposit
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	Accession number given by IDAC: 140515-02 Date of the deposit or of the transfer ¹ : May 14th, 2015
IV. Viability Statement	
The viability of the deposit identified above was tested on (most recent test date): June 1st, 2015 On that date, the deposit was ☒ Viable ☐ No longer viable	
V. Conditions Under Which the Viability Test has Been Performed ²	
VI. International Depositary Authority of Canada	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: June 1st, 2015

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer)² To be filled in if the information has been requested and if the results of the test are negative.

International Depositary Authority of Canada

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

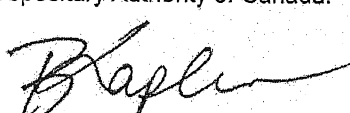
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030

Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty Regulations*)

I. Party to Whom This Viability Statement is Issued	
Name: Melanie Szweras Bereskin & Parr LLP	Address: Scotia Plaza 40 King Street West, 40th floor Toronto, ON M5H 3Y2
II. Depositor	III. Identification of the Deposit
Name: John Husnik, Renaissance BioScience Corp Address: 410-2389 Health Sciences Mall Vancouver, B.C. V6T 1Z3	Accession number given by IDAC: 140515-03 Date of the deposit or of the transfer ¹ : May 14th, 2015
IV. Viability Statement	
The viability of the deposit identified above was tested on (most recent test date): June 1st, 2015 On that date, the deposit was ☒ Viable ☐ No longer viable	
V. Conditions Under Which the Viability Test has Been Performed ²	
VI. International Depositary Authority of Canada	
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of Canada: 	Date: June 1st, 2015

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer)² To be filled in if the information has been requested and if the results of the test are negative.

Statement of Viability 1/1

File #: 173 (15)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm men công nghiệp được phân lập phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng, chủng nấm men này được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước sau:

a) cấy chuyển chủng nấm men công nghiệp kiểu đại, mà biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện asparaginaza gắn thành tế bào, với sự có mặt của môi trường chứa nguồn nitơ duy nhất là D-asparagin;

b) cấy chuyển liên tục, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần để tạo ra tế bào có nhiều đột biến ngẫu nhiên so với tế bào trước khi cấy chuyển;

c) chọn lọc các giống cấy trong bước b) khi tốc độ sinh trưởng đạt đến đường cơ sở;

d) cấy chuyển liên tục tế bào trong môi trường chọn lọc chứa metylamin, theo dõi tốc độ sinh trưởng và gây đột biến hằng tuần cho đến khi tốc độ sinh trưởng, với sự có mặt của metylamin, đạt đến tốc độ sinh trưởng trong môi trường chọn lọc không chứa metylamin để làm giàu đối với tế bào có nhiều đột biến ngẫu nhiên liên quan so với tế bào trước khi cấy chuyển trong môi trường chọn lọc chứa metylamin;

e) phân lập các khuẩn lạc riêng lẻ trong bước d) bằng cách rĩa cấy trên môi trường chọn lọc chứa metylamin, cho các khuẩn lạc này sinh trưởng và chọn lọc các khuẩn lạc lớn và sinh trưởng nhanh;

f) thử nghiệm các khuẩn lạc được chọn trong bước e) về khả năng phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng và chọn lọc ít nhất một khuẩn lạc có hoạt tính phân giải L-asparagin cao so với các tế bào tại thời điểm bắt đầu bước d);

g) lặp lại bước d) đến bước f), làm tăng nồng độ metylamin mỗi lần, cho đến khi hoạt tính phân giải L-asparagin đạt đến trạng thái ổn định;

h) phân lập chủng từ bước g) trong đó hoạt tính phân giải L-asparagin đã đạt đến trạng thái ổn định.

2. Chủng nấm men công nghiệp được phân lập theo điểm 1, trong đó chủng nấm men công nghiệp này có nhiều hơn 18.000 đột biến di truyền đặc trưng.

3. Chủng nấm men công nghiệp được phân lập được nộp lưu tại Cơ quan nộp lưu quốc tế của Canada (IDAC) dưới số truy cập 140515-01 (RBAR-01), trong đó chủng nấm men này phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng.
4. Chủng nấm men công nghiệp được phân lập được nộp lưu tại Cơ quan nộp lưu quốc tế của Canada (IDAC) dưới số truy cập 140515-02 (RBAR-02), trong đó chủng nấm men này phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng.
5. Chủng nấm men công nghiệp được phân lập được nộp lưu tại Cơ quan nộp lưu quốc tế của Canada (IDAC) dưới số truy cập 140515-03 (RBAR-03), trong đó chủng nấm men này phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng.
6. Thực phẩm có nồng độ asparagin hoặc acrylamit giảm chứa chủng nấm men công nghiệp theo điểm 3.
7. Thực phẩm có nồng độ asparagin hoặc acrylamit giảm chứa chủng nấm men công nghiệp theo điểm 4.
8. Thực phẩm có nồng độ asparagin hoặc acrylamit giảm chứa chủng nấm men công nghiệp theo điểm 5.

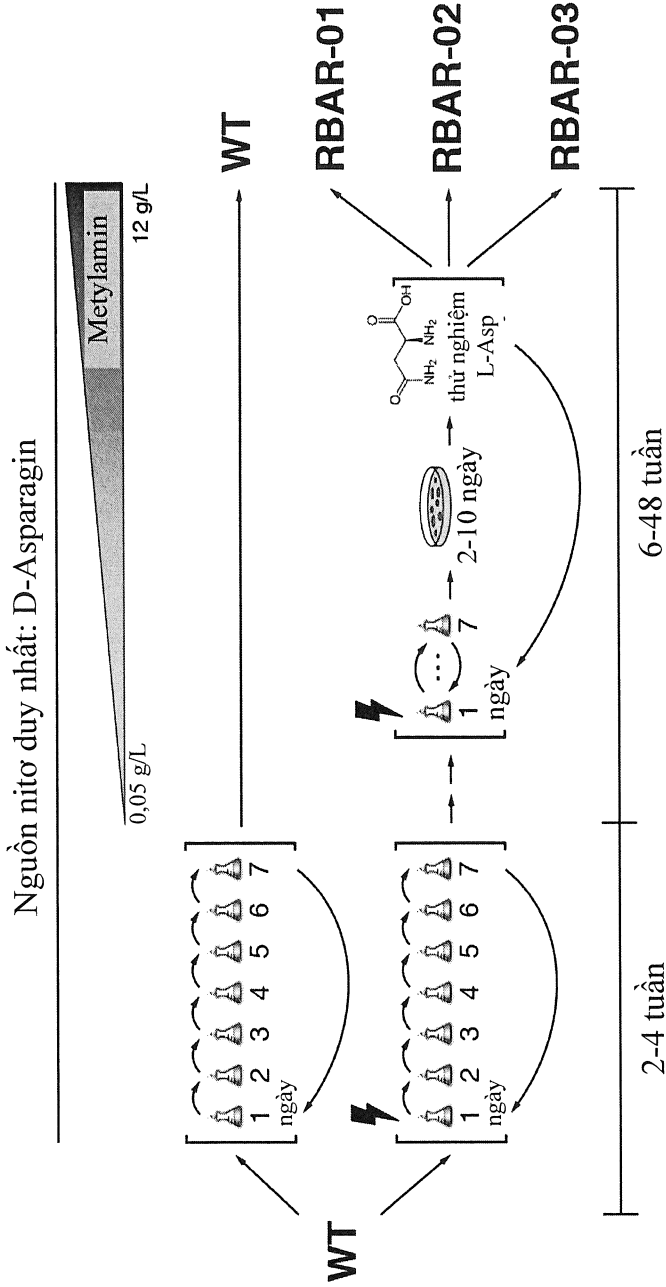
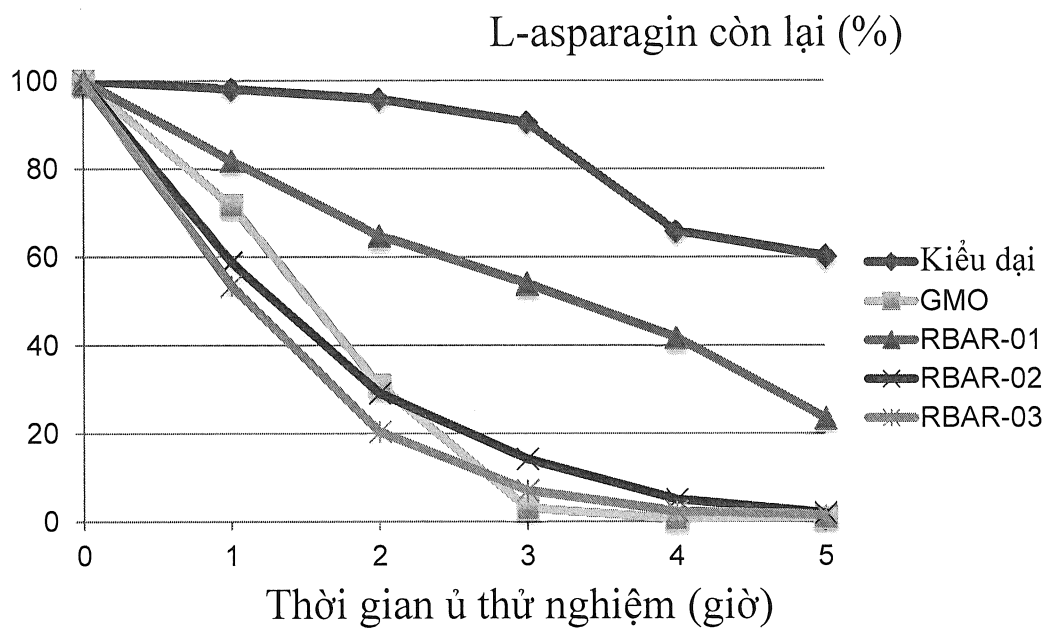


Fig.1

Fig. 2



3/20

Fig. 3

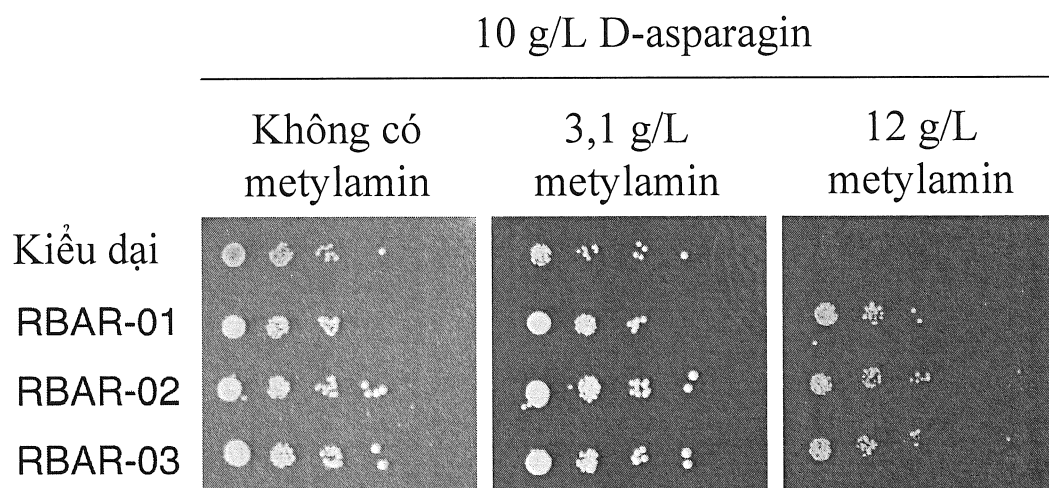
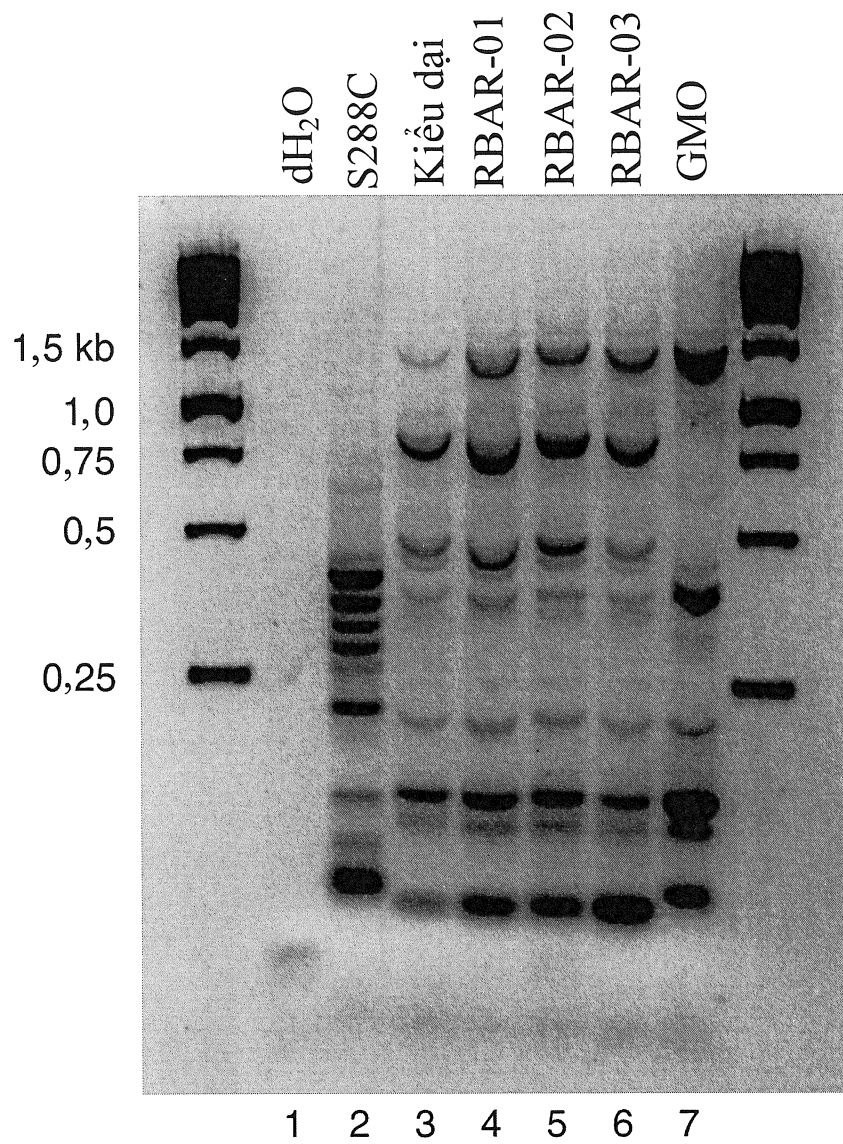


Fig. 4



5/20

Fig. 5

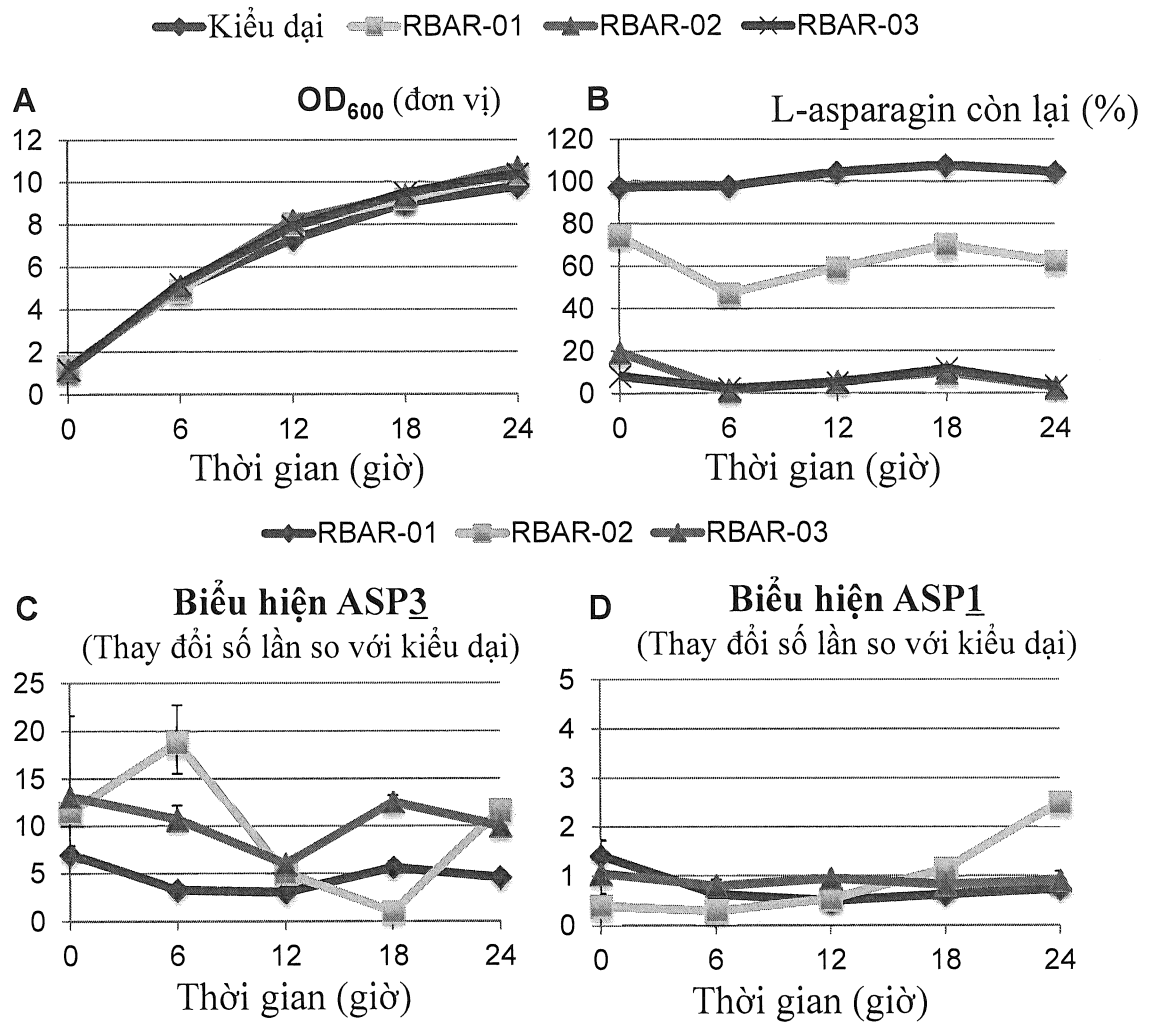
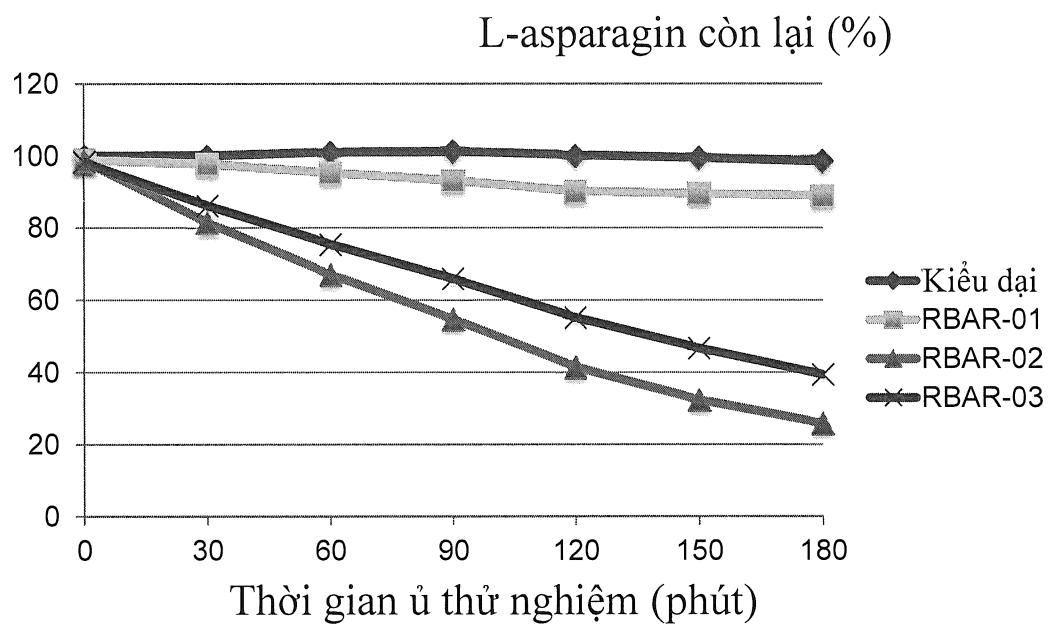


Fig. 6



7/20

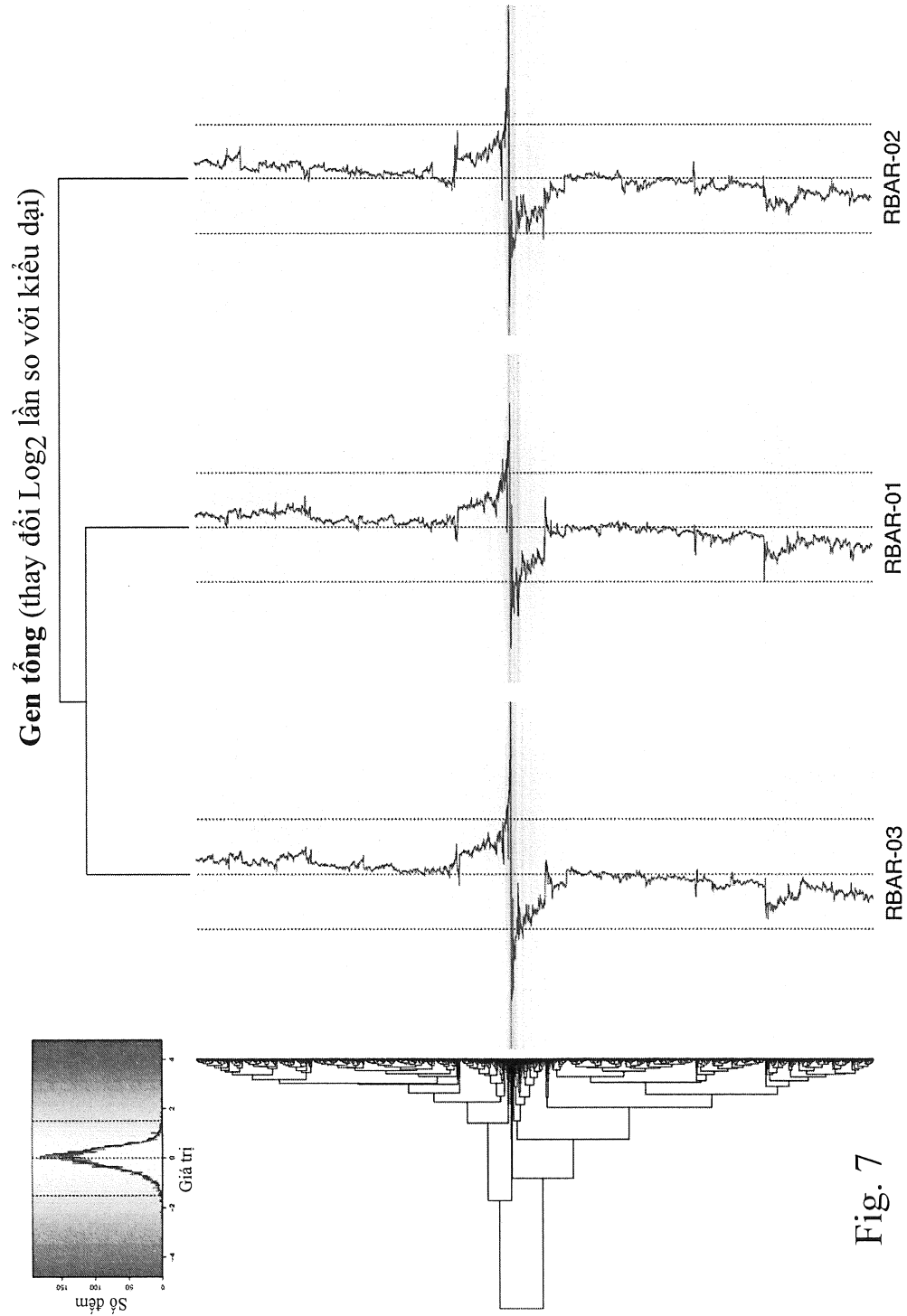


Fig. 7

8/20

Gen biểu hiện chênh lệch (thay đổi Log₂ lần so với kiểu dại)

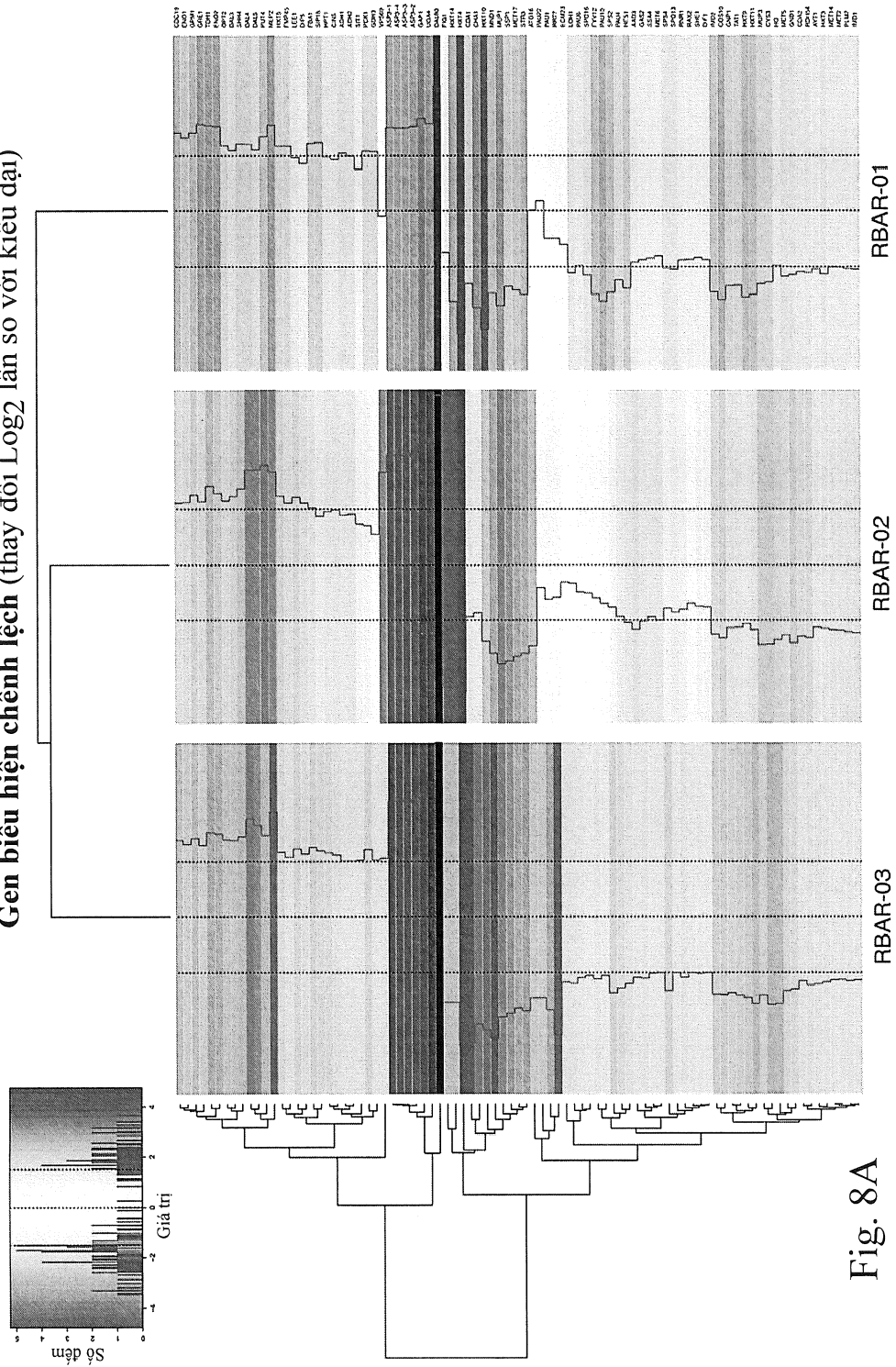
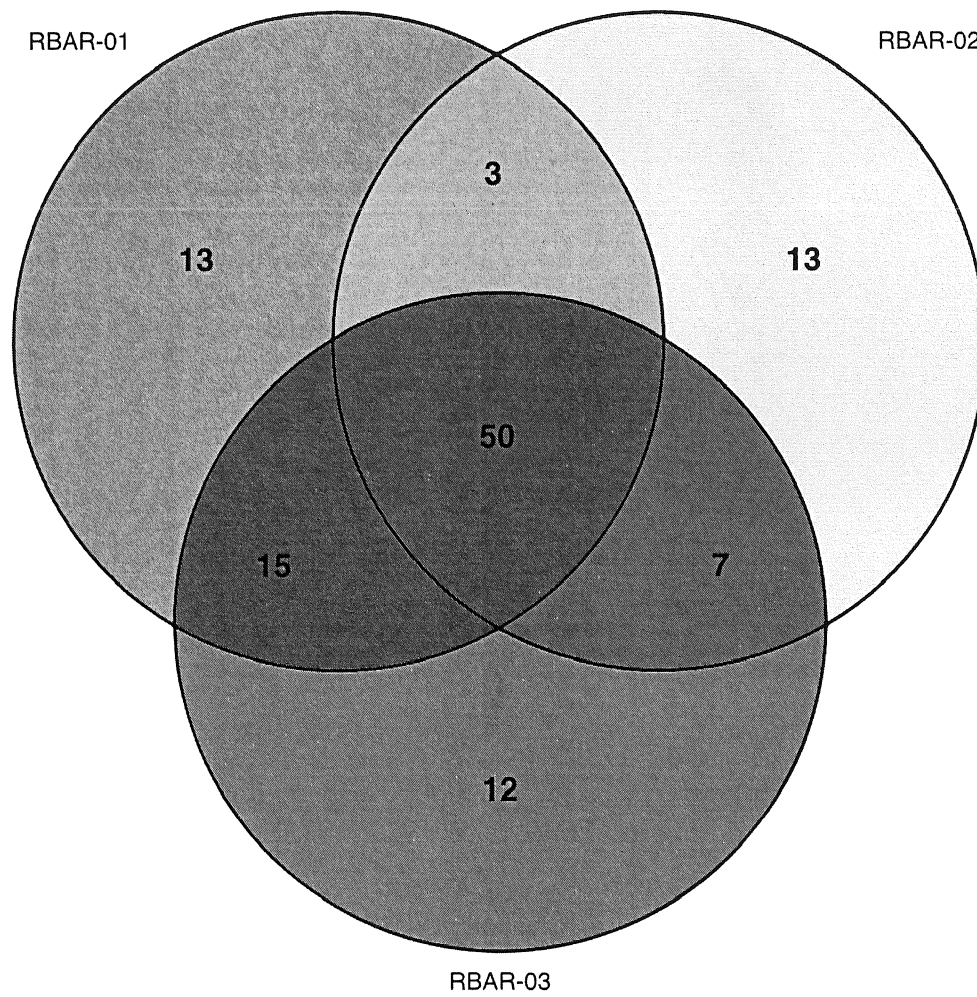


Fig. 8A

9/20

Fig. 8B



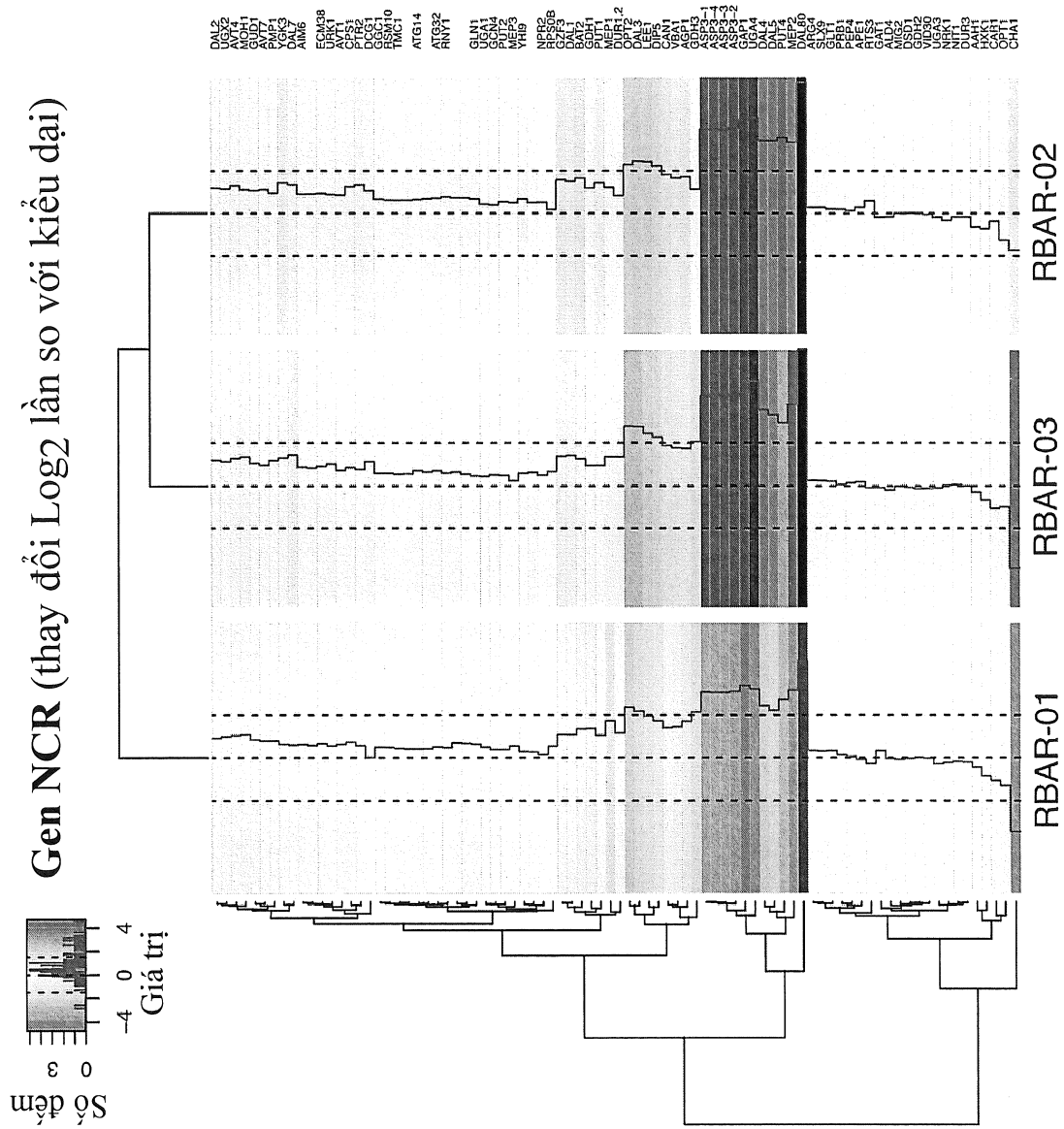


Fig. 9A

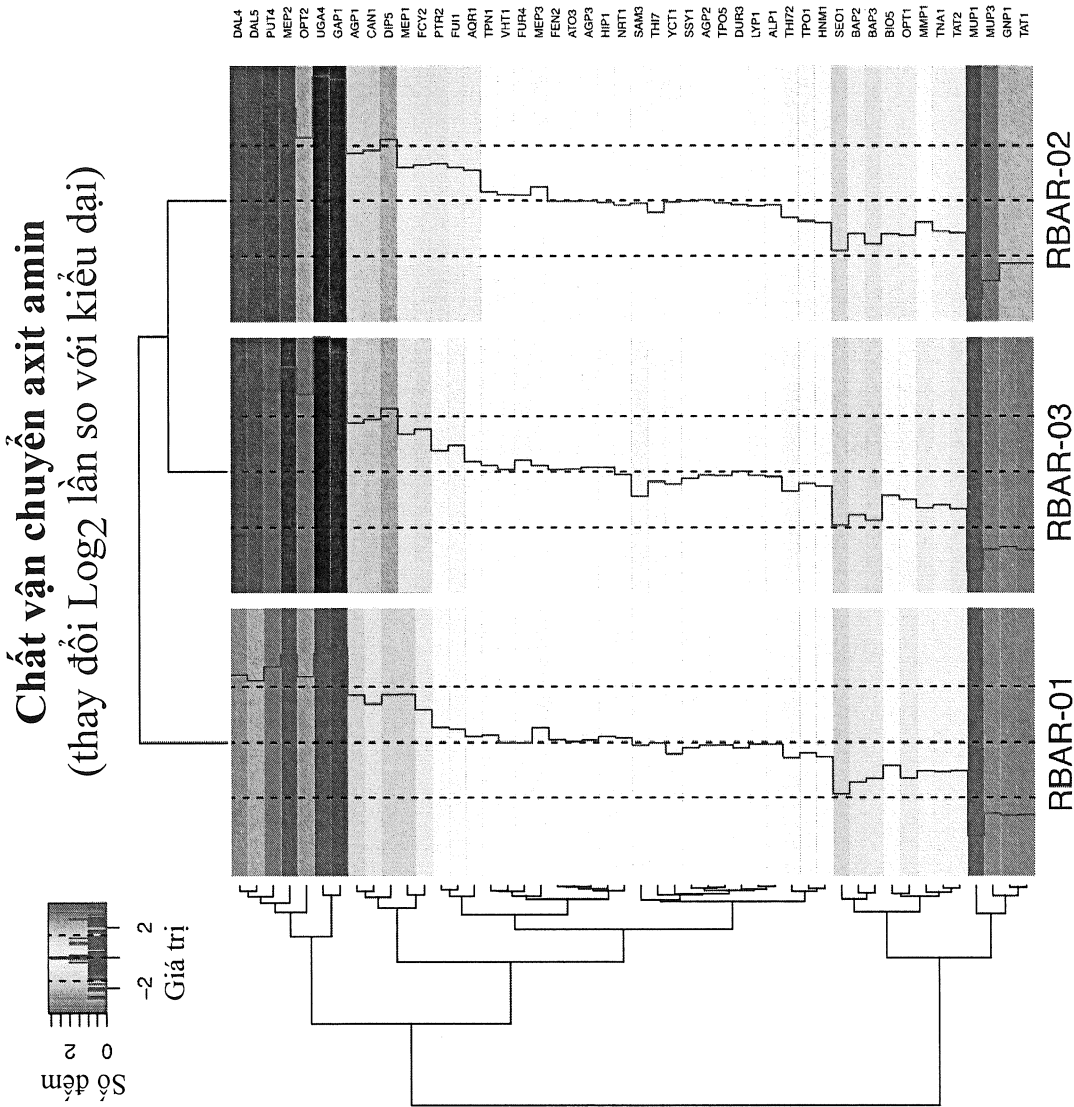


Fig. 9B

12/20

Fig. 10

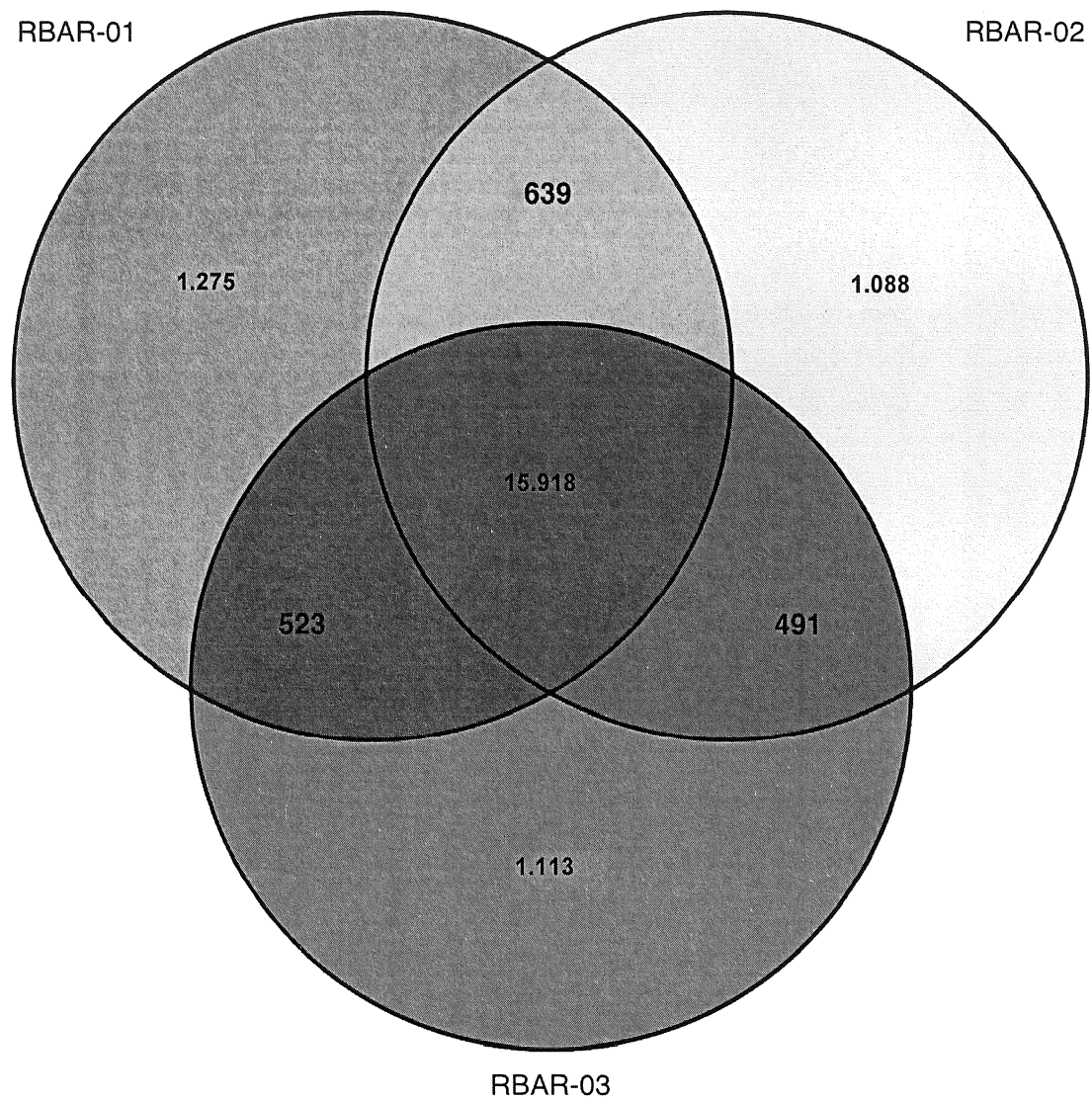


Fig. 11

■ Kiểu đại ■ RBAR-01 ■ RBAR-02 ■ RBAR-03

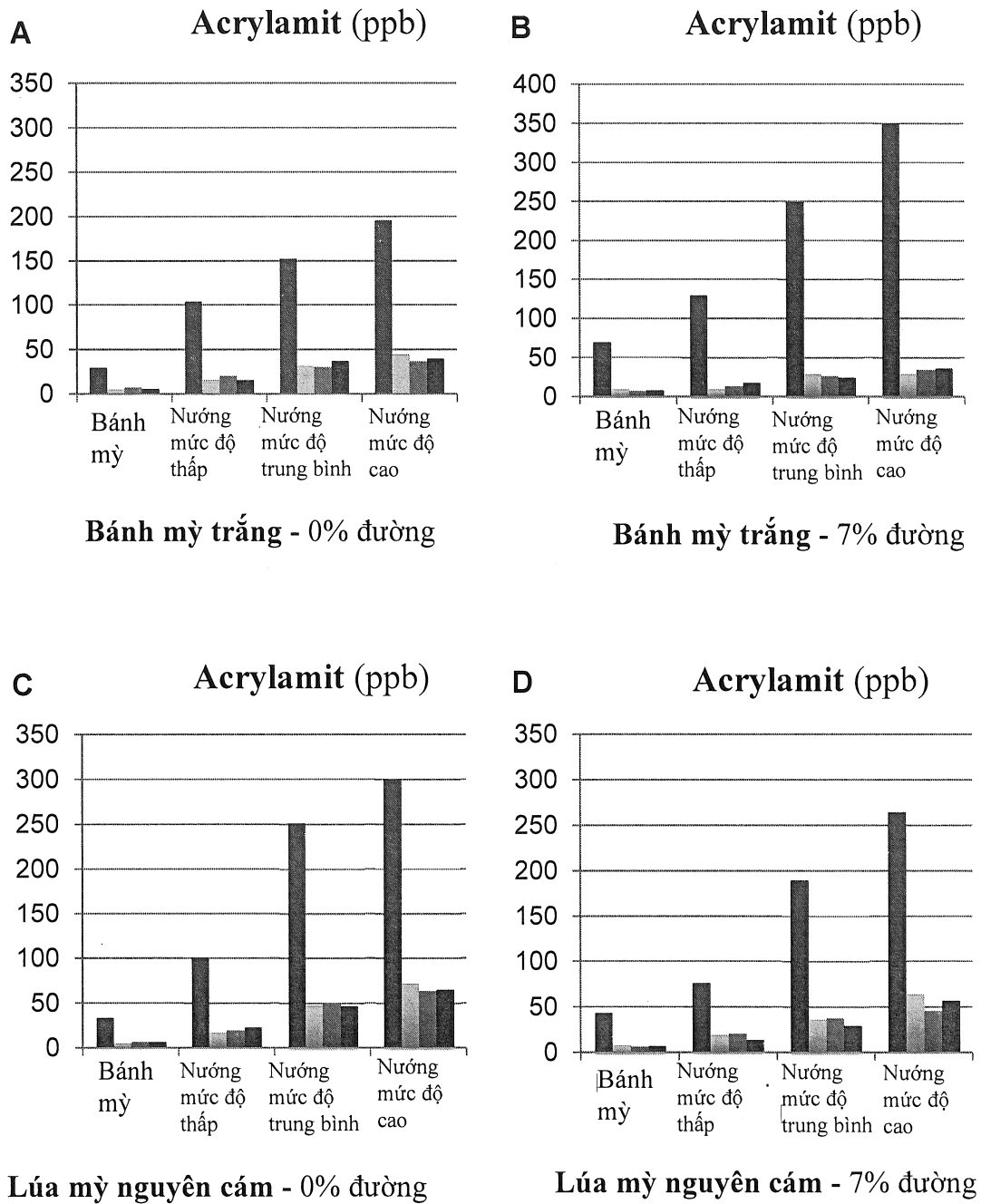


Fig. 12

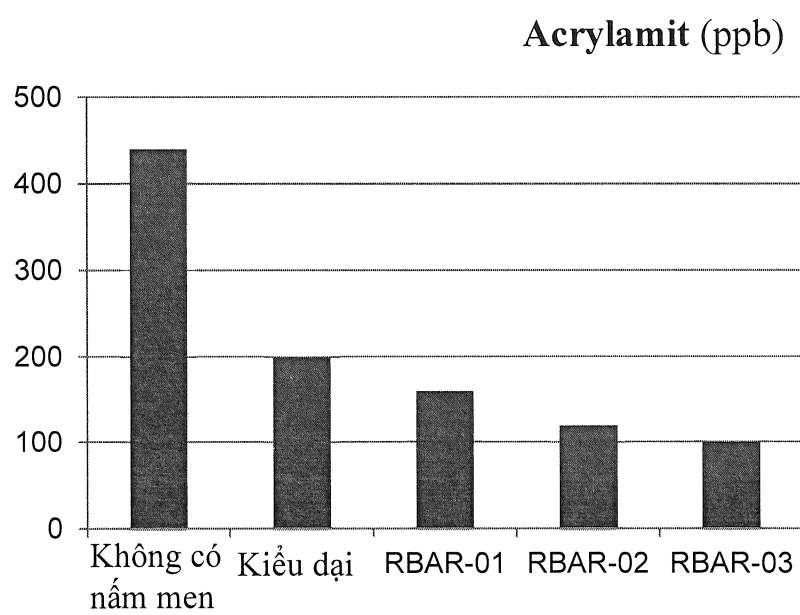


Fig. 13

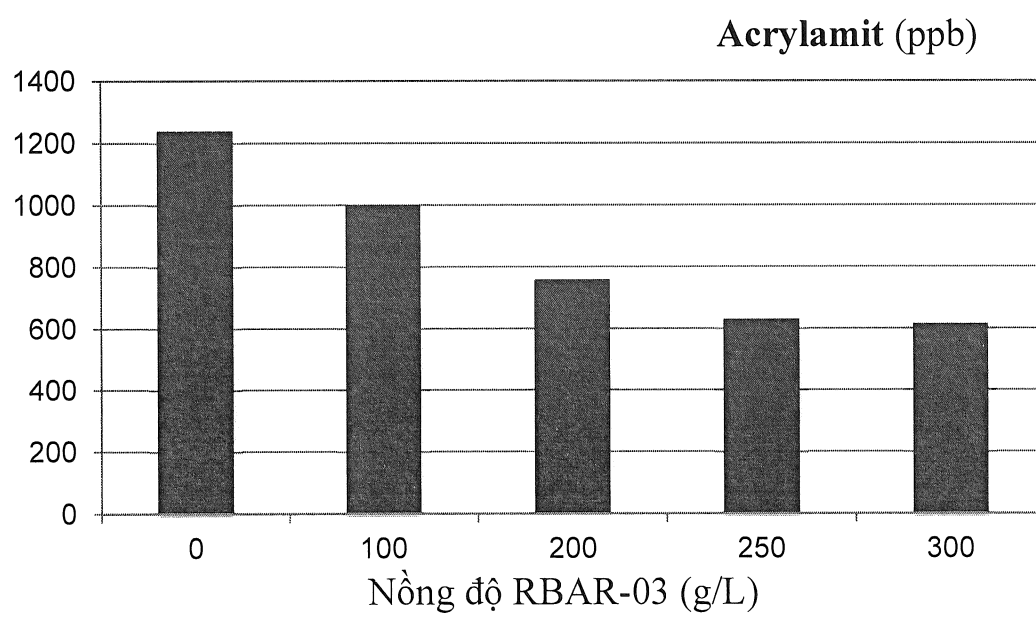


Fig. 14

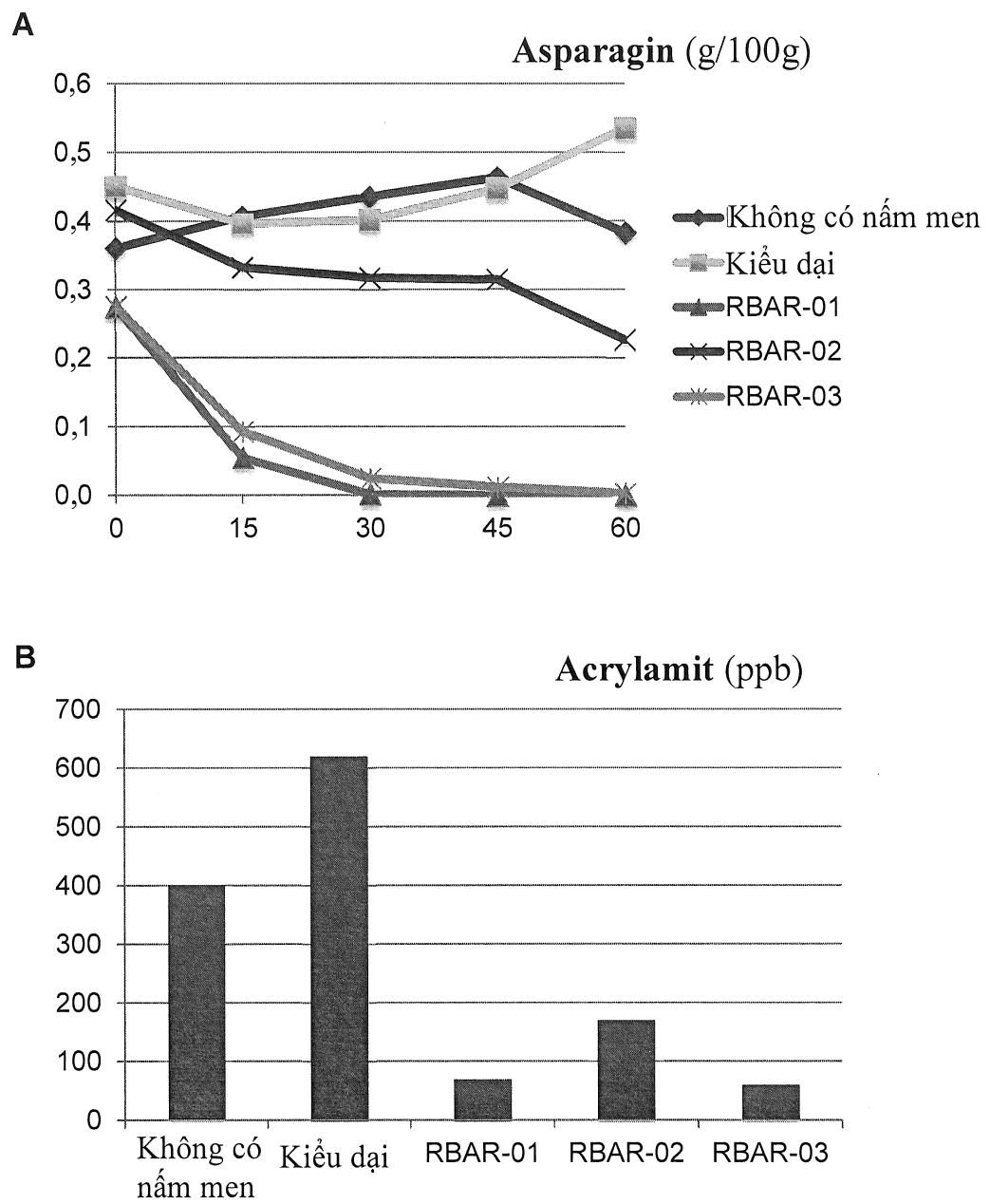


Fig. 15

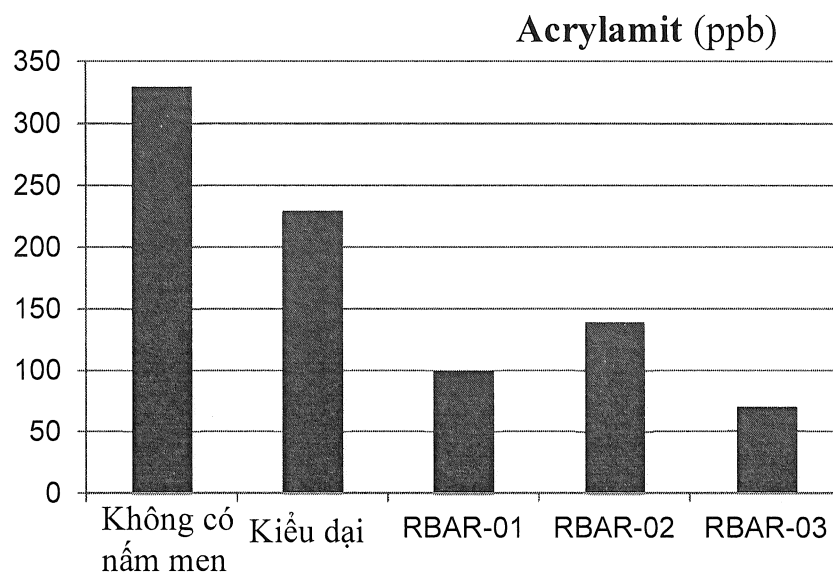
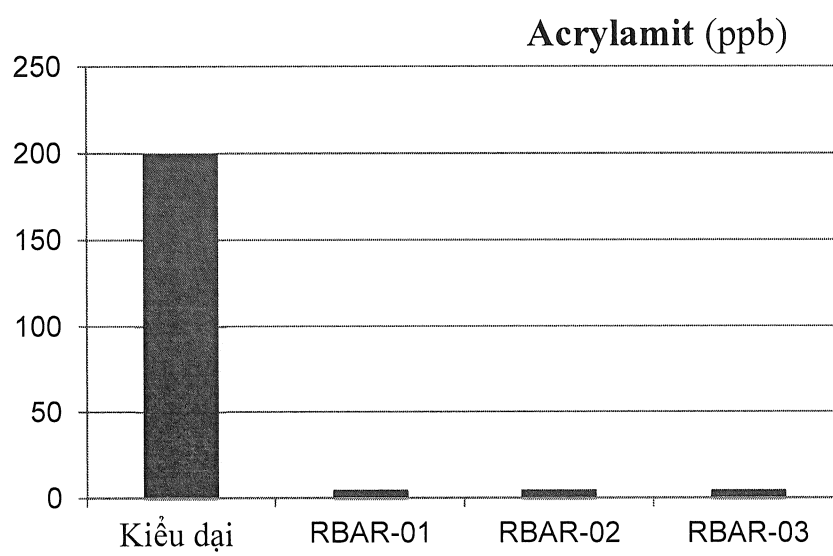
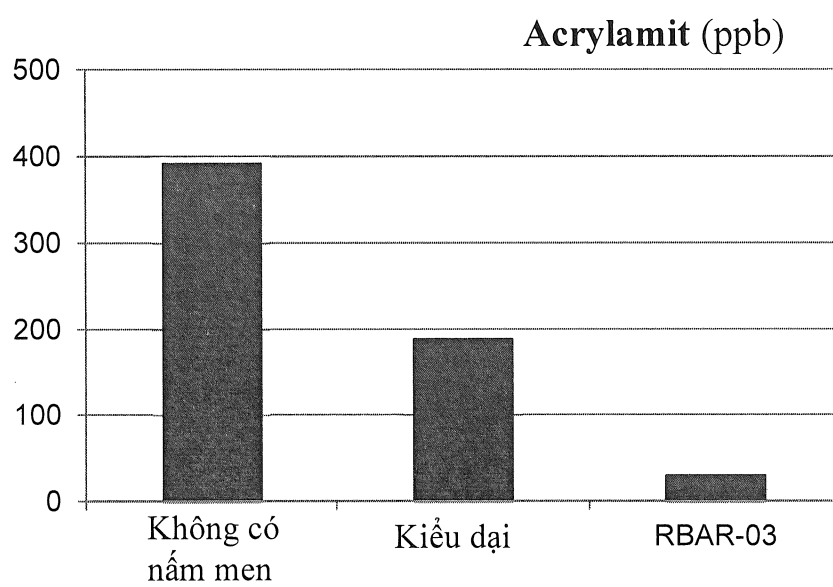


Fig. 16



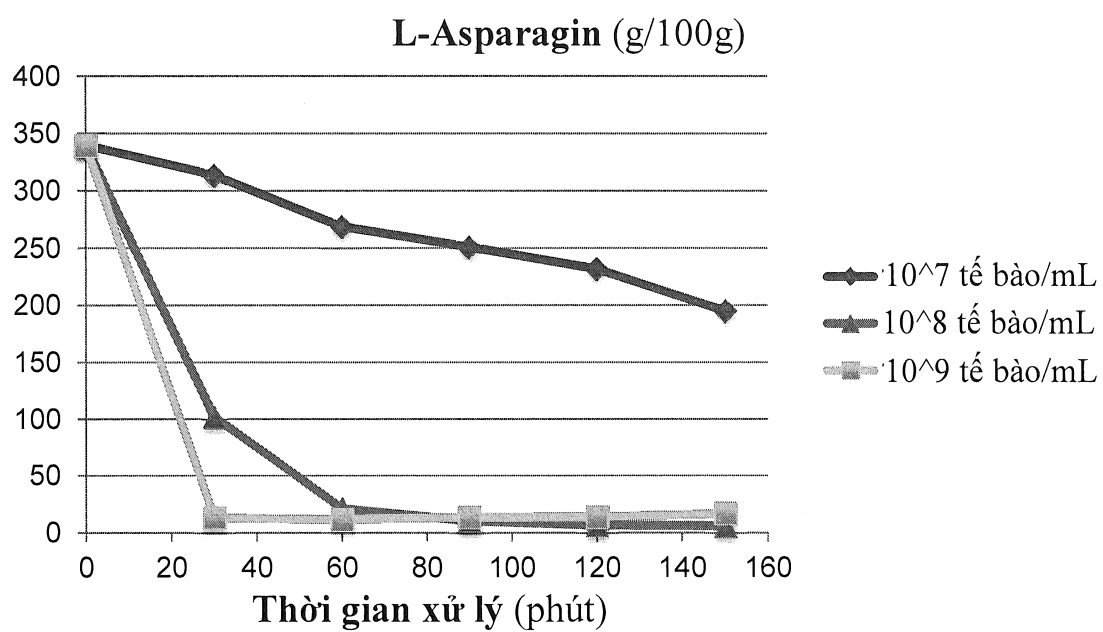
19/20

Fig. 17



20/20

Fig. 18



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Renaissance BioScience Corp.

<120> Chủng nấm men công nghiệp được phân lập phân giải L-asparagin trong điều kiện không gây cảm ứng và thực phẩm có nồng độ asparagin hoặc acrylamit giảm chứa chủng nấm men này

<130> 23756-P48552PC00

<150> US 62/189,547

<151> 2015-07-07

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn nối tổng hợp

<400> 1

tcaacaatgg aatcccaac

19

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn nối tổng hợp

<400> 2

catcttaaca ccgtatatga

20

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn nối tổng hợp

<400> 3

gagcggatga acagggatat t

21

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 4
 ggggtctgtga ggttggaat
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 5
 caaactgaga gtggacggta ag
 22

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 6
 gttgactata gctggcggaa a
 21

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 7
 cgtctggatt ggtggttcta tc
 22

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 8
ggaccacttt cgtcgtattc tt
22