



(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)



1-0046120

(51)^{2020.01} A23J 1/18; C12N 1/06

(13) B

(21) 1-2020-06104

(22) 26/04/2019

(86) PCT/EP2019/060750 26/04/2019

(87) WO/2019/207111 31/10/2019

(30) 1853748 27/04/2018 FR

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/03/2021 396A

(73) LESAFFRE ET COMPAGNIE (FR)

41 rue Etienne Marcel, Paris, 75001, France

(72) Rudy MENIN (FR); Pauline SPOLAORE (FR); Isabelle MOULY (FR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) PHƯƠNG PHÁP THU LẤY PROTEIN NẤM MEN

(21) 1-2020-06104

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thu lấy protein nấm men, bao gồm các bước sau: a) tạo ra váng nấm men; b) cho váng nấm men này tiếp xúc với co nguyên sinh bằng nhiệt ở nhiệt độ từ 70 đến 95°C, trong thời gian từ 30 giây đến 4 giờ, tốt hơn nếu trong thời gian từ 1 phút đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 40 phút đến 2 giờ; b') phân tách phần không tan và phần tan; c) đem toàn bộ đi hoạt hóa bằng ít nhất một ribonucleaza và một glucanaza, tuần tự hoặc cùng một lúc, ở nhiệt độ từ 40 đến 65°C, tốt hơn nếu là 60°C trong thời gian từ 8 đến 24 giờ; tốt hơn nếu đến 18 giờ; d) phân tách phần không tan và phần tan; trong đó phần không tan thu được ở bước d) không có mùi vị, có hàm lượng nucleotit nhỏ hơn 3% và hàm lượng protein thực ít nhất là 72%. Bước b' là tùy ý có thể thực hiện hoặc không. Trong trường hợp này, toàn bộ thành phần thu được sau khi co nguyên sinh bằng nhiệt của váng nấm men được đưa đi hoạt hóa bằng enzym.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực protein có nguồn gốc từ vi sinh vật, và cụ thể hơn là có nguồn gốc từ nấm men, được sử dụng rộng rãi cho dinh dưỡng, sức khỏe và hạnh phúc của con người và động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein đại diện cho thành phần chính trong mô người và động vật. Từ quan điểm dinh dưỡng, protein bị thủy phân bởi proteaza và peptidaza thành peptit và axit amin. Axit amin cấu thành nên các nguyên tố thiết yếu cho cơ thể như nitơ, carbohydrat và lưu huỳnh. Cơ thể không cố định nitơ khoáng cho sự kết hợp của chúng trong các phân tử hữu cơ: do đó nitơ được tạo ra bởi các axit amin. Axit amin chứa lưu huỳnh tạo ra lưu huỳnh quan trọng cho quá trình trao đổi chất. Axit amin cũng là nguyên tố thiết yếu để tổng hợp protein, peptit và các chất có trọng lượng phân tử thấp thiết yếu về mặt sinh lý như glutathion, creatin, dopamin, serotonin, v.v.. Nhu cầu protein dùng cho dinh dưỡng của người và động vật do đó ngày càng tăng lên cùng với sự gia tăng dân số thế giới. Do đó, cần phải tìm các nguồn protein bổ sung và/hoặc thay thế cho protein động vật. Protein đã được thu hồi từ thực vật (ngũ cốc, cây họ đậu) hoặc côn trùng. Việc thu lấy protein có nguồn gốc từ vi sinh vật dựa vào cơ chế lên men đã được biết đến trong nhiều thế kỷ. Protein vi sinh vật là thành phần của toàn bộ tế bào hoặc của thành tế bào, hoặc là các protein phân lập. Một trong những nhược điểm của protein có nguồn gốc vi sinh vật để làm thức ăn cho người là hàm lượng axit nucleic của các chất phân lập. Hàm lượng này phải thật thấp vì một trong các sản phẩm cuối của quá trình chuyển hóa axit nucleic là axit uric mà cơ thể người, thiếu enzym uricaza cần thiết cho quá trình dị hóa nó, không thể phân hủy. Các nhược điểm khác là, ví dụ như hiệu suất chiết hoặc độ tinh khiết của protein thu được thông qua việc phân lập từ vi sinh vật.

Sau khi ly giải tế bào, ví dụ, tế bào nấm men, protein thường được thu hồi trong pha “hiểm”, tức là pha hòa tan, tương ứng với chiết xuất nấm men và chứa các hợp chất có nhiều mùi vị. Tuy nhiên, mùi vị có thể là nhược điểm tùy thuộc vào ứng

dụng dự tính của chiết xuất protein thu được.

Ba bằng sáng chế của cùng một nhóm tác giả liên quan đến việc thu lấy các chiết xuất protein đặc.

Bằng sáng chế Mỹ số US3867555 mô tả một phương pháp cho phép chiết xuất protein thu được có hàm lượng axit nucleic thấp. Các tế bào bị vỡ về mặt cơ học (áp suất cao, siêu âm) hoặc bị vỡ về mặt hóa học (tự phân giải, enzym bên ngoài) sao cho protein vẫn nằm trong phần tan. Tuy nhiên, các protein này được trộn với sản phẩm của quá trình thủy phân, tức là, với các axit amin, peptit và polysaccarit hoặc đường đơn. Sau khi ly tâm để tách và loại bỏ phần không tan, protein được kết tủa và xử lý kiểm cho phép thủy phân các axit nucleic, cái mà sau đó được loại bỏ bằng cách lọc. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi tổng số của các protein “không bị thủy phân” là rất thấp.

Bằng sáng chế Mỹ số US3887431 mô tả việc sử dụng enzym nucleaza nội sinh được tìm thấy trong phần tan sau khi ly giải nấm men, để phân hủy axit nucleic. Bước cô đặc chân không cho phép thu được cả chiết xuất protein đặc và sản phẩm có ít mùi và vị.

Bằng sáng chế Mỹ số US3991215 mô tả phương pháp, mà sau khi tế bào bị vỡ, sử dụng đun nóng nhiệt độ cực cao phần tế bào chất hòa tan, cho phép thu được chiết xuất giàu protein cùng với ít axit nucleic.

Cuối cùng, một vài hướng đi có thể được thực hiện để cải tiến các phương pháp phân lập protein từ vi sinh vật, nhằm thu được độ tinh sạch cao hơn, hiệu suất cao hơn và/hoặc chiết xuất protein có thể được sử dụng trực tiếp cho dinh dưỡng hoặc làm thực phẩm chức năng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trái ngược với hướng đi thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu phát triển một phương pháp lập protein vi sinh vật từ phần không tan thu được sau khi ly giải các vi sinh vật. Phương pháp mới này cho phép thu được các chiết xuất đặc của các protein không bị thủy phân có hàm lượng axit nucleic thấp, ít mùi và vị, và với hiệu suất cao.

Phương pháp theo sáng chế bắt đầu bằng việc ly giải tế bào, tốt hơn nếu thông

qua co nguyên sinh bằng nhiệt dẫn đến bất hoạt các enzym của vi sinh vật và giải phóng vào môi trường các axit amin tự do chứa axit glutamic. Chúng chịu sự tác động của enzym loại glucanaza và enzym loại ribonucleaza, sau đó được phân tách sau khi mà phần không tan đại diện cho sản phẩm quan tâm có hàm lượng protein thực ít nhất là 72%. Theo phương án khác của sáng chế, phân tách lần thứ nhất được tiến hành sau pha co nguyên sinh bằng nhiệt, và chỉ phần không tan chứa protein, polysaccarit và ARN chịu tác động của glucanaza và ribonucleaza và sau đó lại được phân tách một lần nữa để duy trì phần không tan giàu protein

Chiết xuất protein thu được không có mùi và vị và có ít axit nucleic.

Chiết xuất protein vẫn còn chứa lipid có nguồn gốc từ màng tế bào có thể được khử lipid bằng các phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, chẳng hạn như chiết với dung môi loại hexan hoặc etanol, với CO₂ siêu tới hạn hoặc bằng cách xử lý với lipaza hoặc phospholipaza sau đó phân tách khỏi pha hòa tan.

Các protein thu được có thể được sử dụng trực tiếp cho các ứng dụng trong dinh dưỡng, thực phẩm chức năng, v.v..

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa hai phương án chính của phương pháp theo sáng chế. Fig. 1A minh họa phương pháp trong đó không có bước phân tách giữa co nguyên sinh và thủy phân bằng enzym. Fig. 1B minh họa phương pháp trong đó phân tách được thực hiện sau bước co nguyên sinh và trong đó thủy phân bằng enzym được tiến hành trên phần không tan thu được từ việc phân tách này.

Fig. 2 trình bày đặc tính protein tương ứng của chiết xuất protein thu từ phương pháp theo sáng chế, và của chiết xuất protein thông thường thu từ phương pháp đã biết để chiết protein từ phần tan thu được từ bước co nguyên sinh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Vi sinh vật có nghĩa là sinh vật sống không thể nhìn thấy bằng mắt thường nhưng có thể nhìn thấy dưới kính hiển vi. Theo sáng chế, các vi sinh vật tốt hơn nếu

là vi khuẩn (sinh vật nhân sơ) hoặc nấm men (sinh vật nhân thực). Nấm men, ở dạng số ít hoặc số nhiều, là thuật ngữ chung chỉ các sinh vật nhân thực có thể gây ra quá trình lên men chất hữu cơ. Trong số các loại nấm men, không đề cập đầy đủ đến hết là các chủng *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*.

Váng nấm men dùng để chỉ huyền phù của nấm men thu được sau khi nhân lên trong bình và sau khi ly tâm cho phép phân tách huyền phù này ra khỏi chất lỏng xung quanh cũng được gọi là mốc. Nhân lên cũng có thể gọi là nuôi cấy hoặc bao quát hơn là lên men.

Protein là các đại phân tử được hình thành từ chuỗi các axit amin liên kết với nhau thông qua liên kết peptit. Chúng là thành phần cơ bản quan trọng nhất của tất cả các tế bào động vật và thực vật. Chúng đại diện cho lên tới 50% trọng lượng khô của sinh vật và chiếm 15 đến 20% năng lượng lấy vào hàng ngày. Protein thực phẩm và protein cơ thể là nguồn nitơ và axit amin chính có một số chức năng chuyển hóa chính: chúng là cơ chất của quá trình tổng hợp protein, tiền chất của các hợp chất chứa nitơ quan trọng trong cơ thể (axit nucleic, nitơ monoxit, glutathion, v.v.) và là cơ chất của quá trình chuyển hóa năng lượng.

Nói chung, trong thực phẩm nông nghiệp, hàm lượng protein được coi là mức nitơ nhân với 6,25 (hệ số 6,25 lấy từ hàm lượng nitơ trung bình của protein, là $100/6,25$, tức là 16%). Đối với protein thực, nó có nghĩa là hàm lượng protein gần với thực tế được hiệu chỉnh về sai số gây ra bởi nitơ không phải protein, ví dụ, nitơ của axit nucleic. Do đó, để làm công thức, hàm lượng của protein thực có thể được coi là nitơ tổng số trừ đi nitơ từ axit nucleic và nitơ từ amoniac, nhân với 6,25. Ngoài ra, hàm lượng protein thực có thể được ước tính bằng thử nghiệm axit amin tổng số. Protein tự nhiên còn nguyên vẹn, nghĩa là các protein của vi sinh vật ở trạng thái trong đó chúng được tìm thấy trong sinh vật sống. Mở rộng ra, các protein tự nhiên bị biến tính có khả năng cấu dạng không gian bị biến đổi thông qua gấp nếp hoặc đông tụ. Protein cũng có thể bị thủy phân một phần hoặc toàn phần.

Co nguyên sinh có nghĩa là sự phá vỡ vách ngăn không thấm nước của vi sinh vật, tốt hơn nếu là nấm men, hoặc của khía cạnh vách ngăn của nó. Có sự mất nước nhiều hơn nữa đối với sự thẩm thấu của màng.

Phương pháp theo sáng chế được sử dụng cho bất kỳ loại nấm men nào, cụ thể hơn là bất kỳ loại nấm men nào được sử dụng trong dinh dưỡng người hoặc động vật. Từ quan điểm công nghiệp, phương pháp theo sáng chế được thực hiện trên váng nấm men như đã được định nghĩa ở trên, tức là, trên huyền phù của nấm men. Tốt hơn nếu, nấm men được chọn trong số các nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* hoặc *Wickerhamomyces*. Tốt hơn nữa nếu, nấm men được chọn trong số *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia jadinii* (còn được gọi là *Candida utilis*), *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Wickerhamomyces anomalus*, v.v.. Các nấm men này chứa từ 6 đến 11% nitơ. Nitơ được đo bằng phương pháp Kjeldahl đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Như chỉ ra ở trên, hàm lượng protein thực được ngoại suy từ thử nghiệm nitơ này sử dụng hệ số nhân 6,25.

Nuôi cấy nấm men được thực hiện theo các phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Có một quy trình được mô tả trong tài liệu tham khảo “Yeast technology” bởi Gerald Reed và Tilak W. Nagodawithana (ISBN 0-442-31892-8) trang 284 đến 293. Dịch nuôi cấy này, còn được gọi là sinh khối, được thu hoạch bằng cách ly tâm hoặc lọc và có thể được rửa. Thu được váng nấm men.

Các tế bào sau đó bị phá vỡ hóa học hoặc cơ học sử dụng các phương pháp đã biết chẳng hạn như đồng hóa sử dụng áp lực cao, nghiền cơ học, phân hủy bằng siêu âm, chu trình kết đông-rã đông lặp đi lặp lại, sốc thẩm lọc hoặc ly giải bằng enzym. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, nấm men trải qua co nguyên sinh bằng nhiệt tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 95°C, được điều chỉnh theo loại nấm men. Tốt hơn nếu nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C. Việc điều chỉnh nhiệt độ và/hoặc thời gian ly giải nằm trong khả năng của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, như chức năng chống lại các tế bào và/hoặc enzym mà nó muốn bất hoạt ở bước này. Thời gian là từ 30 giây đến 3 giờ, tối đa 4 giờ, tốt hơn là 1 phút, 5 phút, 10 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 1 giờ 30 hoặc 2 giờ, tối đa 3 giờ, thậm chí 4 giờ. Bước co nguyên sinh này cho phép làm biến tính nấm men, làm bất hoạt các enzym nội sinh và thẩm thấu hóa màng cho phép giải phóng phần tan. Phần tan chủ yếu chứa axit amin tự do, peptit nhỏ, khoáng chất và trong số các axit

amin này có một vài cái có tác động đến mùi vị như axit glutamic.

Theo phương án thứ nhất của sáng chế, toàn bộ cái thu được từ bước co nguyên sinh và bao gồm phần tan và phần không tan phải trải qua một hoặc nhiều quá trình hoạt hóa bằng enzym. Mục đích của bước này là hòa tan lượng tối đa các thành phần không phải là protein, mà không tấn công protein. Tốt hơn là hoạt hóa bằng ribonucleaza (EC 3.1.4.1) và hoạt hóa bằng glucanaza (EC 3.2.1) được sử dụng. Hoạt hóa bằng enzym có thể được thực hiện tuần tự hoặc cùng một lúc. Hoạt hóa bằng ribonucleaza sẽ chuyển hóa ARN thành 5' nucleotit và hòa tan nucleotit sau này khiến nó chuyển thành phần tan. Có thể sử dụng một vài ribonucleaza, và ví dụ hỗn hợp của nucleaza nội sinh và ngoại sinh. Tùy ý, có thể sử dụng deaminaza để chuyển hóa AMP thành IMP nhằm khôi phục đặc tính tăng cường mùi vị của phần tan. Hoạt hóa bằng một hoặc nhiều glucanaza sẽ cho phép thành polysaccarit bị hòa tan thành oligosaccarit hòa tan. Thời gian và nhiệt độ phải được điều chỉnh như một hàm của thông số kỹ thuật của các enzym được sử dụng. Nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 65°C, tốt hơn nếu là 60°C. Thời gian là từ 8 đến 24 giờ, tốt hơn là từ 16 đến 24 giờ, tốt hơn nữa là 18 giờ. Bước enzym này đầu tiên là cho phép thu được phần tan mới chứa nucleotit, polysaccarit (khoảng 60% carbohydrat tổng số) và một tỷ lệ nhỏ các axit amin, và thứ hai là phần không tan chủ yếu chứa protein.

Bước cuối cùng là phân tách phần tan và phần không tan.

Theo phương án thứ hai của sáng chế, các phần tan và phần không tan thu được từ bước co nguyên sinh được phân tách. Phần tan được đặt sang một bên, loại bỏ và có thể được thu hồi dưới dạng chiết xuất nấm men. Phần không tan bao gồm vỏ (hoặc thành), polyme, polysaccarit, ARN và protein bị đông tụ bởi nhiệt. Phần không tan này được giữ lại. Phần này trải qua quá trình hoạt hóa bằng enzym ribonucleaza và glucanaza như đã mô tả ra ở trên, theo quy trình ủ tương tự (nhiệt độ, thời gian), và để phân tách phần tan và phần không tan.

Phần tan cuối cùng có thể đặt sang một bên và sử dụng.

Phần không tan cuối cùng, thu được từ quá trình phân hủy bằng enzym, có hàm lượng protein “thật” lớn hơn hoặc bằng 70%, tốt hơn nếu lớn hơn hoặc bằng 72%, 80% và lên đến 85%. Nói chung, nấm men chứa từ 50 đến 55% là protein “thật”.

Với phương pháp theo sáng chế, nó có thể loại bỏ nhiều thành phần và thu lấy sản phẩm có nồng độ protein cao hơn. Tùy ý, hàm lượng lipit trong phần không tan này có thể giảm đi hoặc nhờ vào hoạt động của dung môi (etanol, hexan) hoặc nhờ vào CO₂ siêu tới hạn hoặc thông qua hoạt hóa lipaza hoặc phospholipaza. Có thể thu được protein thật có độ tinh sạch hơn 80%.

Theo một phương án của sáng chế, hoạt động tương ứng của ribonucleaza và glucanaza được thực hiện tuần tự theo thứ tự bất kỳ. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, hoạt hóa bằng ribonucleaza và glucanaza được áp dụng cùng một lúc.

Sản phẩm thu được có thể được sấy đông khô, được sấy bằng phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như sấy phun hoặc sấy chân không, và được bảo quản trong khi vẫn giữ được chất lượng và đặc tính của nó.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp thu lấy protein nấm men, bao gồm các bước sau:

a) tạo ra váng nấm men;

b) cho váng nấm men này tiếp xúc với co nguyên sinh bằng nhiệt ở nhiệt độ từ 70 đến 95°C, trong thời gian từ 1 phút đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 40 phút đến 2 giờ;

c) đem toàn bộ đi hoạt hóa bằng ít nhất một ribonucleaza và một glucanaza, tuần tự hoặc cùng một lúc, ở nhiệt độ từ 40 đến 65°C trong thời gian từ 8 đến 24 giờ;

d) phân tách phần không tan và phần tan,

trong đó phần không tan thu được ở bước d) không có mùi vị, có hàm lượng nucleotit nhỏ hơn 3% và hàm lượng protein thực ít nhất là 72%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu lấy protein nấm men, bao gồm các bước sau:

a) tạo ra váng nấm men;

b) cho váng nấm men này tiếp xúc với co nguyên sinh bằng nhiệt ở nhiệt độ từ 70 đến 95°C, trong thời gian từ 1 phút đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 40 phút đến hai

giờ;

b') phân tách phần không tan và phần tan;

c) đem phần không tan đi hoạt hóa bằng ít nhất một ribonucleaza và một glucanaza, tuần tự hoặc cùng một lúc, ở nhiệt độ từ 40 đến 65°C trong thời gian từ 8 đến 24 giờ;

d) phân tách phần không tan ra khỏi phần tan,

trong đó phần không tan thu được ở bước d) không có mùi vị, có hàm lượng nucleotit nhỏ hơn 3% và hàm lượng protein thực ít nhất là 72%.

Trong phần còn lại của mô tả, phần không tan được thu được ở bước d) cũng có thể được gọi là “chiết xuất protein (nấm men) theo sáng chế”. Ngược lại, chiết xuất protein nấm men thu được theo phương pháp theo kỹ thuật trước đây, từ phần tan thu được từ quá trình co nguyên sinh có thể gọi là “chiết xuất protein thông thường”.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, váng nấm men ở bước a) thu từ quá trình lên men của các loại nấm men được chọn từ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* tốt hơn nếu là *Pichia jadinii*, *Kluyveromyces* tốt hơn nếu là *Kluyveromyces marxianus* hoặc *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia* tốt hơn nếu là *Yarrowia lipolytica*, hoặc *Wickerhamomyces* tốt hơn nếu là *Wickerhamomyces anomalus*. Tốt hơn là nấm men được chọn từ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia jadinii* hoặc *Kluyveromyces marxianus*. Nấm men được ưu tiên là *Saccharomyces cerevisiae*.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, bước co nguyên sinh bằng nhiệt a) được thực hiện tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, hoạt hóa bằng glucanaza và ribonucleaza được áp dụng cùng một lúc.

Tùy ý, hoạt hóa bằng deaminaza cũng được áp dụng

Ưu điểm là, váng men được sử dụng ở bước a) có chứa nấm men giàu selen. Nuôi cấy nấm men giàu selen có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như phương pháp

được mô tả trong đơn sáng chế số EP 1478732. Hàm lượng selen trong dịch nuôi cấy nấm men có thể đạt tới 3000 ppm hoặc thậm chí cao hơn.

Sản phẩm thu được từ phần không tan có hàm lượng nitơ protein riêng biệt lớn hơn hoặc bằng 11,5% chất khô, tức là 72% protein thực (sử dụng hệ số hoán đổi 6,25 đã cho ở trên). Thông thường, nấm men có hàm lượng nitơ tối đa là 11%, tạo ra 69% protein tiềm năng. Nấm men cũng chứa vật liệu nitơ không phải protein (axit nucleic, ARN, ADN). Khi lấy nitơ tổng số trừ đi nitơ nucleic, nấm men chỉ còn chứa từ 50 đến 55% là protein. Do đó, hàm lượng protein tối thiểu là 72% thu được trong phần không tan cuối cùng là đặc trưng của phương pháp theo sáng chế. Trong cùng một phần không tan này, hàm lượng nucleotit tổng số là từ 0,8 đến 1,5% và lên đến 3%, hàm lượng carbohydrat tổng số là từ 1 đến 8% (thử nghiệm anthron đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này), với các hàm lượng tương ứng 0,2 đến 4% đối với glucan, 0,2 đến 4% đối với mannan, 7 đến 15% đối với lipit, 1 đến 7% đối với chất khoáng. Cần quan tâm đến việc phân biệt giữa chiết xuất protein nấm men thu được bằng phương pháp theo sáng chế và chiết xuất trong lĩnh vực kỹ thuật trước đó, cụ thể là chiết xuất protein thu được từ phần tan sau bước ly giải và cô đặc tế bào, sẽ có hàm lượng protein ít nhất là 72% và có thể có hàm lượng nucleotit nhỏ hơn 3%.

Nhằm mục đích này, lipit tổng số được thử nghiệm trên các chiết xuất protein có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*, sử dụng phương pháp phân tích trọng lượng sau khi thủy phân bằng axit và chiết bằng hexan trên thiết bị Soxhlet. Mức lipit cao hơn 7% một cách có hệ thống. Do đó, phần không tan thu được ở bước d) trong phương pháp chiết theo sáng chế cũng có hàm lượng lipit cao hơn 7%. Trong khi đó, hàm lượng lipit nhỏ hơn 1% trong chiết xuất protein từ nấm men “thông thường”. Hàm lượng lipit có thể khác nhau tùy theo loài hoặc chủng nấm men. Nhìn chung, đối với một sản phẩm công nghiệp, vi sinh vật bắt đầu được chỉ ra trong bảng số liệu kỹ thuật. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể suy ra và đưa ra kết luận tổ hợp loài/hàm lượng lipit trong chiết xuất protein.

Đối với chiết xuất protein nấm men theo sáng chế đã trải qua bước khử lipit, hàm lượng lipit có thể không đủ để phân biệt giữa hai nguồn gốc. Sau đó, việc đánh

giá đặc tính độ tan protein trong chiết xuất protein có thể hoàn thành phân tích so sánh. Phần trăm độ tan được xác định theo phương trình sau:

$$\% \text{ độ tan} = \frac{\% \text{ N tổng số trong dịch nổi}}{\% \text{ N ban đầu trong môi trường phản ứng}}$$

trong đó %N dùng để chỉ phần trăm nitơ, được xác định theo phương pháp Kjeldahl.

Độ tan của chiết xuất protein theo sáng chế là dưới 3,5% trong nước.

Trong khi đó, chiết xuất protein từ nấm men “thông thường” được cho là tan và chỉ chứa từ 5 đến 10% các nguyên tố không tan.

Với mục đích tương tự, đặc tính trọng lượng phân tử được so sánh giữa chiết xuất protein nấm men theo sáng chế và chiết xuất protein trong lĩnh vực kỹ thuật trước đây. Chiết xuất protein nấm men thu được theo sáng chế không có đỉnh trọng lượng phân tử thấp. Hầu hết protein được phân bố khoảng 40-45 kDa. Các hợp chất nhỏ nhất được tìm thấy vào khoảng 500 Da, tương ứng với các peptit nhỏ. Trong khi đó, protein nấm men “thông thường” có một vài đỉnh trọng lượng phân tử và lượng lớn trọng lượng phân tử thấp. Có thể suy ra các đặc tính này và đo tỷ lệ:

$$\frac{\text{axit amin tổng số} - \text{axit amin tự do}}{\text{axit amin tổng số}}$$

(axit amin được thử nghiệm bằng phương pháp xét nghiệm thông thường đối với axit amin trong thực phẩm, ví dụ, phương pháp chính thức của Quy chuẩn (EC) N°152/2009). Tỷ lệ này gần bằng 1, luôn lớn hơn 0,9 đối với chiết xuất protein nấm men theo sáng chế, trong khi tỷ lệ này nằm trong khoảng 0,30 đến 0,85 đối với chiết xuất protein nấm men “thông thường”.

Sản phẩm thu được bằng phương pháp theo sáng chế khác với các chiết xuất protein đã biết thông qua nguồn gốc vi sinh vật của nó, nói cách khác là không phải thực vật và không phải động vật, hàm lượng protein cao, hàm lượng axit nucleic thấp và giữ lại sự có mặt của lipit màng tế bào nếu không tiến hành khử lipit. Ngoài ra, nó không có mùi vị. Nguồn gốc vi sinh vật của chúng cũng có ưu điểm là nó có nguồn gốc từ một nguyên liệu thô không gây dị ứng.

Protein nấm men có ưu điểm chính là về chất lượng dinh dưỡng của chúng.

Do đó, sản phẩm thu được bằng phương pháp theo sáng chế là nguồn protein có ưu điểm chính: chất lượng của nó, được biểu thị bằng điểm số PDCAAS (điểm số axit amin điều chỉnh khả năng phân hủy protein) là 1, nghĩa là tương tự như điểm số của protein động vật tham chiếu như casein và ovalbumin. Đánh giá chất lượng protein giúp có thể xác định khả năng đáp ứng nhu cầu chuyển hóa của nó. Do đó, bất kỳ ứng dụng nào liên quan đến dinh dưỡng và thực phẩm chức năng hoặc đều có thể sử dụng chiết xuất protein thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Các ứng dụng được trích dẫn ở đây không đầy đủ.

Trong ngữ cảnh dinh dưỡng, sức khỏe và hạnh phúc của con người, chiết xuất protein nói trên có thể được sử dụng để kiểm soát cân nặng, làm chất bổ sung cho vận động viên hoặc người già, như thực phẩm chức năng hoặc dưới dạng thanh hoặc đồ uống giàu protein. Ví dụ, chiết xuất protein nói trên có thể được sử dụng như một nguồn protein không phải động vật cho chế độ ăn thuần chay, ví dụ, trong sữa khuấy, bánh mì kẹp thịt, gà chiên cốm, thịt nguội làm từ thực vật, nhân bánh bao, thịt viên, cốm yến mạch, các chế phẩm tạo hương vị mì ống. Tương tự, bánh mì hoặc các sản phẩm làm bánh mì giàu protein có thể sử dụng các chiết xuất protein thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Như đã chỉ ra trước đây, các chiết xuất protein này có ưu điểm là chúng không tạo ra mùi vị, vị đắng hoặc mùi lạ, đặc trưng của một số protein có nguồn gốc thực vật hoặc tảo ngày nay. Về sức khỏe con người, chiết xuất protein này có thể được sử dụng cho dinh dưỡng trẻ em hoặc dinh dưỡng lâm sàng, tức là dinh dưỡng dùng theo đường miệng hoặc đường ruột để khắc phục tình trạng mất cân bằng dinh dưỡng. Thuận lợi là, khi chiết xuất protein thu được từ váng nấm men giàu selen, nó có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng kích thích khả năng miễn dịch và/hoặc cải thiện chất lượng của da, tóc và/hoặc móng tay.

Cuối cùng, chiết xuất protein này có thể sử dụng làm nguồn cấp protein trong thức ăn chăn nuôi. Thuận lợi là, khi chiết xuất protein được thu từ loại váng nấm men giàu selen, động vật sẽ được hưởng lợi từ nguồn cung cấp kết hợp của protein và selen, selen cho biết là có khả dụng sinh học vì nó được tích hợp trong các protein ở dạng selenomethionin.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chiết xuất protein nấm men có hàm

lượng protein thực ít nhất là 72%, thu được theo phương pháp của sáng chế, làm thực phẩm chức năng để kiểm soát cân nặng, cho người già hoặc vận động viên, việc sử dụng chiết xuất protein này làm nguồn protein không phải động vật trong đồ uống, sản phẩm bánh mì nướng hoặc thịt nguội có nguồn gốc thực vật, việc sử dụng chiết xuất protein này trong dinh dưỡng lâm sàng dùng theo đường miệng hoặc đường ruột, hoặc việc sử dụng chiết xuất protein này cho dinh dưỡng động vật. Nói cách khác, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bổ sung thực phẩm cho dinh dưỡng người và/hoặc dinh dưỡng động vật, bao gồm các bước:

- thu lấy chiết xuất protein nấm men bằng cách thực hiện phương pháp thu protein nấm men theo sáng chế; và

- dùng chiết xuất protein này cho cá thể người làm thực phẩm chức năng để kiểm soát cân nặng, cho người già hoặc cho vận động viên, và/hoặc cho động vật làm protein nạp vào.

Như đã đề cập trước đây, phân tan cuối cùng của phương pháp theo sáng chế cũng có thể được đặt sang một bên và được sử dụng. Lượng carbohydrat tổng số cao, nó có thể được so sánh với một loại nước trái cây. Hàm lượng carbohydrat tổng số từ 45 đến 70%. Carbohydrat này ở dạng glucan (25 đến 40%) và mannan (25 đến 35%), cho phép sử dụng phân tan này để kích thích miễn dịch, đặc biệt là đối với sức khỏe động vật. Tùy thuộc vào loại glucanaza được sử dụng, glucoza tự do cũng có thể được giải phóng. Phân tan này giàu nucleoti tổng số, cụ thể hơn ở 5'-GMP và 5'-IMP khi AMP được chuyển hóa thành IMP bởi deaminaza. Do đó, nó được sử dụng như một chất điều vị. Khi AMP không được chuyển hóa thành IMP, sản phẩm có thể được sử dụng để che đi vị đắng hoặc mùi lạ, như được mô tả trong đơn sáng chế FR1762074. Thành phần của nó cũng làm cho nó trở thành cơ chất phát triển tốt cho các vi sinh vật khác nhau, và đặc biệt là vi khuẩn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây nhằm mục đích minh họa các khía cạnh của sáng chế. Chúng không được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế chiết xuất protein đặc (>75%) từ *Saccharomyces cerevisiae*

Tiến hành lên men *Saccharomyces cerevisiae* dưới các điều kiện cho phép đạt được nồng độ nitơ cao của nấm men, khoảng 10% chất khô là nitơ. Sử dụng phân tách bằng ly tâm lên mốc của quá trình lên men này để thu được váng nấm men ở 16-18% chất khô là nấm men, và rửa sạch váng.

Trong phòng thí nghiệm, tiến hành co nguyên sinh bằng nhiệt 3 kg váng đã rửa sạch, giàu nitơ này: đưa nhiệt độ của váng đến nhiệt độ đã chọn trong khoảng 70 đến 95°C bằng máy trao đổi sau đó ủ 3 kg váng này trong cốc có mỏ ngâm trong bể nước nóng. Đảo trộn váng và duy trì nhiệt độ của váng trong cốc có mỏ trong 2 giờ. Sau đó hạ nhiệt độ của môi trường phản ứng xuống 60°C. Chuyển một phần vào bình nón Erlenmeyer 500 mL. Nhúng bình nón Erlenmeyer vào bể nước nóng có nhiệt độ được điều chỉnh thành 60°C. Thêm các liều lượng enzym sau: 0,2% (g trên 100 g váng) hỗn hợp hai glucanaza và 0,1% hỗn hợp ribonucleaza nội sinh và ngoại sinh. Ủ 18 giờ trong điều kiện đảo trộn. Ly tâm sau khi ủ. Đặt phần tan có chứa nucleotit tự do, polysaccarit và một tỷ lệ nhỏ các axit amin sang một bên. Phần không tan là chiết xuất protein nấm men. Sau 3 lần rửa, thành phần của chúng như sau: 13,0% nitơ, 3% nucleotit tổng số và 4,7% carbohydrat tổng số, tức là 77% protein thực.

Ví dụ 2: Điều chế chiết xuất protein đặc (>75%) từ *Saccharomyces cerevisiae* theo biến thể của phương pháp 1.

Biến thể của phương pháp được mô tả trong ví dụ 1, sau khi co nguyên sinh bằng nhiệt, phân tách phần không tan ra khỏi dịch nổi chứa axit amin tự do bằng ly tâm. Phần không tan được hấp thụ trong một thể tích nước chính tương đương với thể tích dịch nổi phía trên bị loại bỏ và được ly tâm một lần nữa. Hoạt động này được thực hiện tổng cộng 3 lần. Cuối cùng, thu hồi 2 kg phần không tan tại 16% chất khô chứa vật liệu protein, polysaccarit và nucleic. Chuyển phần này sang bình nón Erlenmeyer 500 mL. Ngâm bình nón Erlenmeyer vào bể nước nóng có nhiệt độ được điều chỉnh thành 60°C và áp dụng phần còn lại của phương pháp như được mô tả trong ví dụ trên.

Thành phần của chiết xuất protein cuối cùng thu được như sau: 12,2% nitơ, 1,4% nucleotit tổng số và 2,9% carbohydrat tổng số, tức là 75% protein thực.

Ví dụ 3: Điều chế chiết xuất protein đặc (>80%) từ *Saccharomyces cerevisiae*

Với các bước co nguyên sinh bằng nhiệt, phân tách bằng ly tâm và rửa, điều chế phần không tan của *Saccharomyces cerevisiae* chứa vật liệu protein, polysaccarit và nucleic theo quy trình được mô tả trong Ví dụ 2.

Điều chỉnh chiết xuất khô của phần này thành 14% và pH đến pH tối ưu của enzym. Ủ 200g phần này dưới điều kiện đảo trộn trong bình nón Erlenmeyer ngâm trong bể nước nóng tại 60°C trong 18 giờ với sự có mặt của các liều lượng enzym như sau: 0,2% chế phẩm lỏng đã tinh sạch của glucanaza và 0,1% hỗn hợp ribonucleaza nội sinh và ngoại sinh. Thu lấy phần không tan bằng ly tâm và rửa 3 lần. Chiết xuất protein thu được chứa 13,6% nitơ, 2,4% nucleotit tổng số và 4,2% carbohydrat tổng số, tức là 83% protein thực.

Ví dụ 4: Điều chế nhanh chiết xuất protein đặc (>75%) từ *Saccharomyces cerevisiae*

Theo biến thể của phương pháp được mô tả trong ví dụ 2, thời gian ủ giảm xuống còn 8 giờ. Chiết xuất protein thu được chứa 12,5% nitơ, 3% nucleotit tổng số và 4,4% carbohydrat tổng số, tức là 75% protein thực.

Ví dụ 5: Điều chế chiết xuất protein đặc (80%) từ *Saccharomyces cerevisiae*

Theo biến thể của phương pháp được mô tả trong ví dụ 2, chiết xuất protein được sấy khô trước khi chiết với năm thể tích etanol, được rửa, để ráo và một lần nữa làm khô trong chân không. Chiết xuất protein thu được chứa 13,3% nitơ, 2% nucleotit tổng số và 3,1% carbohydrat tổng số, tức là 81% protein thực.

Ví dụ 6: Điều chế chiết xuất protein đặc từ *Pichia jadini*

Tiến hành lên men *Pichia jadini* dưới các điều kiện cho phép hàm lượng nấm men thu được trong vùng là 9% chất khô. Sử dụng phân tách bằng ly tâm đối với mốc của quá trình lên men này để thu được váng nấm men ở 11-13% chất khô là nấm men, và rửa sạch váng.

Trong phòng thí nghiệm, tiến hành co nguyên sinh bằng nhiệt trên 3 kg váng giàu nitơ tại nhiệt độ từ 70 đến 95°C trong 2 giờ theo quy trình tương tự áp dụng cho chủng *Saccharomyces cerevisiae*. Thu lấy phần không tan bằng ly tâm và rửa 3 lần.

Điều chỉnh chiết xuất khô của phần này thành 11 -13% và pH đến pH tối ưu của enzym. Ủ 200g phần này dưới điều kiện đảo trộn trong bình nón Erlenmeyer

ngâm trong bể nước nóng tại 60 °C trong 18 giờ với sự có mặt của các liều lượng enzym như sau: 0,2% chế phẩm lỏng đã tinh sạch của glucanaza và 0,1% hỗn hợp ribonucleaza nội sinh và ngoại sinh. Thu lấy phần không tan bằng ly tâm và rửa 3 lần. Chiết xuất protein thu được chứa 11,7% nitơ, 1,4% nucleotit tổng số và 13,1% carbohydrat tổng số, tức là 72% protein thực.

Ví dụ 7: Điều chế chiết xuất protein đặc từ *Kluyveromyces marxianus*.

Tiến hành lên men *Kluyveromyces marxianus* dưới các điều kiện cho phép hàm lượng nấm men thu được trong vùng là 8% chất khô. Sử dụng phân tách ly tâm đối với quá trình lên men này để thu được váng nấm men và rửa sạch váng. Áp dụng co nguyên sinh bằng nhiệt, ly tâm, rửa phần không tan và ủ với hỗn hợp các enzym có chứa glucan và ribonucleaza nội sinh và ngoại sinh theo quy trình đã mô tả trước đây. Ly tâm thêm một thời gian nữa và rửa phần không tan có chứa protein.

Chiết xuất protein thu được chứa 11,8% nitơ, 1,3% nucleotit tổng số và 8,8% carbohydrat tổng số, tức là 72% protein thực.

Ví dụ 8: Thử nghiệm lipid tổng số trong chiết xuất protein “không tan” thu được bằng phương pháp theo sáng chế và so sánh với hàm lượng lipid của chiết xuất protein nấm men “thông thường” được chiết từ phần tan của nấm men sau khi ly giải tế bào theo kỹ thuật trước đây.

Phương pháp được sử dụng là phương pháp phân tích trọng lượng sau đó thủy phân bằng axit và chiết với hexan trên thiết bị Soxhlet. Phương pháp này được mô tả trong quy chuẩn EC số 152/2009. Kết quả được trình bày trong Bảng 1 bên dưới. Từ ba mẻ chiết xuất protein thu được theo sáng chế, các kết quả này cho thấy hàm lượng lipid gần bằng 10 đến 11g trên 100 g chiết xuất. Trong khi đó, chiết xuất protein nấm men theo kỹ thuật trước đây, thu được từ phần tan của nấm men đã được ly giải, cho thấy hàm lượng lipid dưới 1 g trên 100 g chiết xuất.

	Chiết xuất protein theo sáng chế (Từ phần không tan)			Chiết xuất protein theo kỹ thuật trước đó (từ phần tan)
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	
Lipid tổng số (g/100g)	11,2	10,8	11,1	<1

Ví dụ 9: Xác định đặc tính hòa tan của protein

Trên mẫu thu từ mẻ 1 của chiết xuất protein theo sáng chế (kham khảo ví dụ 8), đặc tính hòa tan của protein được xác định tại ba giá trị pH khác nhau trong dung dịch chứa nước và sử dụng nồng độ protein cuối cùng là 2% (trọng lượng/thể tích). Sau thời gian hòa tan 60 phút trong điều kiện đảo trộn ở nhiệt độ môi trường, dịch nổi phía trên được thu bằng cách ly tâm và hàm lượng nitơ tổng số trong dịch nổi phía trên được xác định bằng phương pháp Kjeldahl phù hợp với tiêu chuẩn NF EN ISO 5983-2. Đối với mỗi giá trị pH, phần trăm độ tan được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ độ tan} = \frac{\%N \text{ tổng số trong dịch nổi}}{\%N \text{ ban đầu trong môi trường phản ứng}}$$

Kết quả thu được là dưới 3,5%.

Ví dụ 10: Xác định đặc tính trọng lượng phân tử tương ứng của chiết xuất protein theo sáng chế và chiết xuất protein “thông thường”.

Như theo tất cả những điều đã nói ở trên, “chiết xuất protein theo sáng chế” dùng chỉ chiết xuất protein nấm men thu được từ phần không tan của tế bào nấm men đã ly giải. Ngược lại, chiết xuất protein nấm men “thông thường” dùng để chỉ protein nấm men thu được bằng cách chiết từ phần tan của tế bào nấm men đã ly giải. Việc chiết được thực hiện bằng các phương pháp đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Như đã nêu trong Ví dụ 9, chiết xuất protein theo sáng chế không tan trong nước. Các điều kiện cụ thể để hòa tan và phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước đã được nghiên cứu phát triển. Quy trình như sau (phương pháp SEC1 trong Fig. 2):

- hòa tan 10 mg mẫu trong 5 mL pha động (được đảo trộn trong 48 giờ ở 90°C),
- phân tích dung dịch thu được trên cột gel Agilent® PL, 20 µm MIXED-A (2 000 đến 40 000 000 g/mol, tương đương PS) ở 40°C.

Pha động: DMSO/LiCl 0,25 M.

RI (chỉ số khúc xạ) và máy dò UV (280 nm).

Phương pháp (phương pháp SEC2 trong Fig. 2) được sử dụng cho chiết xuất

protein nấm men “thông thường” được lấy từ chuyên khảo của OIV (International Organisation of Vine and Wine):

- độ tan của mẫu trong nước;
- phân tích trên cột SUPERDEX 200 10/300 GL (10 000 đến 600 000 Da, đương lượng protein hình cầu; 1 000 đến 100 000 g/mol, đương lượng dextran).

Pha động: đệm phosphat + 0,25 M NaCl, pH 7,2

Phát hiện UV ở 214, 260 và 280 nm.

Các đặc tính protein tương ứng được trình bày trong Fig. 2.

Chiết xuất protein của nấm men theo sáng chế được phân bố khoảng 45 kDa và không có đỉnh của trọng lượng phân tử thấp (khoảng 2-10 kDa). Trong khi đó, đặc tính chiết xuất protein của nấm men “thông thường” có sự khác biệt đáng kể: nó có hai đỉnh riêng biệt trong phạm vi trọng lượng phân tử thấp, 2-10 kDa, và tổng thể là một cấu hình có các đỉnh khác biệt hơn và trải dài hơn.

Thử nghiệm của axit amin tổng số và axit amin tự do theo phương pháp chính thức được đưa ra trong Quy chuẩn EC số 152/2009 của EU cũng cho phép xác định tỷ lệ:

$$\frac{\text{axit amin tổng số} - \text{axit amin tự do}}{\text{axit amin tổng số}}$$

Giá trị này rất gần với 1 (hoặc 100%) và luôn lớn hơn 0,9 (hoặc 90%) đối với chiết xuất protein nấm men theo sáng chế (xác định trên 3 mẻ mà lipit được thử nghiệm trong Ví dụ 8). Nó thường nằm trong khoảng từ 0,30 đến 0,85 (30 đến 85%) đối với chiết xuất protein nấm men “thông thường” của chủ đơn và chiết xuất bán sẵn trên thị trường.

Ví dụ 11: Điều chế chiết xuất protein đặc (>75%) từ dịch nuôi cấy *Saccharomyces cerevisiae* giàu selen

Một mẻ váng nấm men giàu selen được thực hiện bằng phương pháp chiết protein được mô tả trong Ví dụ 1 hoặc Ví dụ 2. Hàm lượng selen trong váng nấm men này là gần 3 200 ppm.

Hàm lượng nitơ tổng số trong chiết xuất protein thu được là 13,5%, hàm lượng protein thực là 76,7%. Tổng hàm lượng selen là 4 750 ppm (mg Se/kg, khô). Hàm lượng selenomethionin là 84% (Eq. Se/Se tot). Trong khi đó, nấm men được selen hóa SelSaf®3000, nguồn selen hữu cơ khả dụng sinh học, có 63% hàm lượng là selenomethionin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thu lấy protein nấm men, bao gồm các bước sau:

a) tạo ra váng nấm men;

b) cho váng nấm men này tiếp xúc với co nguyên sinh bằng nhiệt ở nhiệt độ từ 70 đến 95°C, trong thời gian từ 30 giây đến 4 giờ, tốt hơn nếu trong thời gian từ 1 phút đến 3 giờ, tốt hơn nữa là từ 40 phút đến 2 giờ;

b') phân tách phần không tan và phần tan;

c) đem phần không tan đi hoạt hóa bằng ít nhất một ribonucleaza và một glucanaza, tuần tự hoặc cùng một lúc, ở nhiệt độ từ 40 đến 65°C, tốt hơn nếu là 60°C trong thời gian từ 8 đến 24 giờ; tốt hơn nếu đến 18 giờ;

d) phân tách phần không tan và phần tan;

trong đó phần không tan thu được ở bước d) không có mùi vị, có hàm lượng nucleotit nhỏ hơn 3% và hàm lượng protein thực ít nhất là 72%.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hoạt hóa bằng deaminaza cũng được sử dụng tại bước c).

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nấm men được chọn trong số các loài *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Wickerhamomyces*.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nấm men được chọn trong số *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các enzym được sử dụng tại bước c) được sử dụng cùng một lúc.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phần không tan thu được từ bước d) cũng có hàm lượng lipid cao hơn 7%.

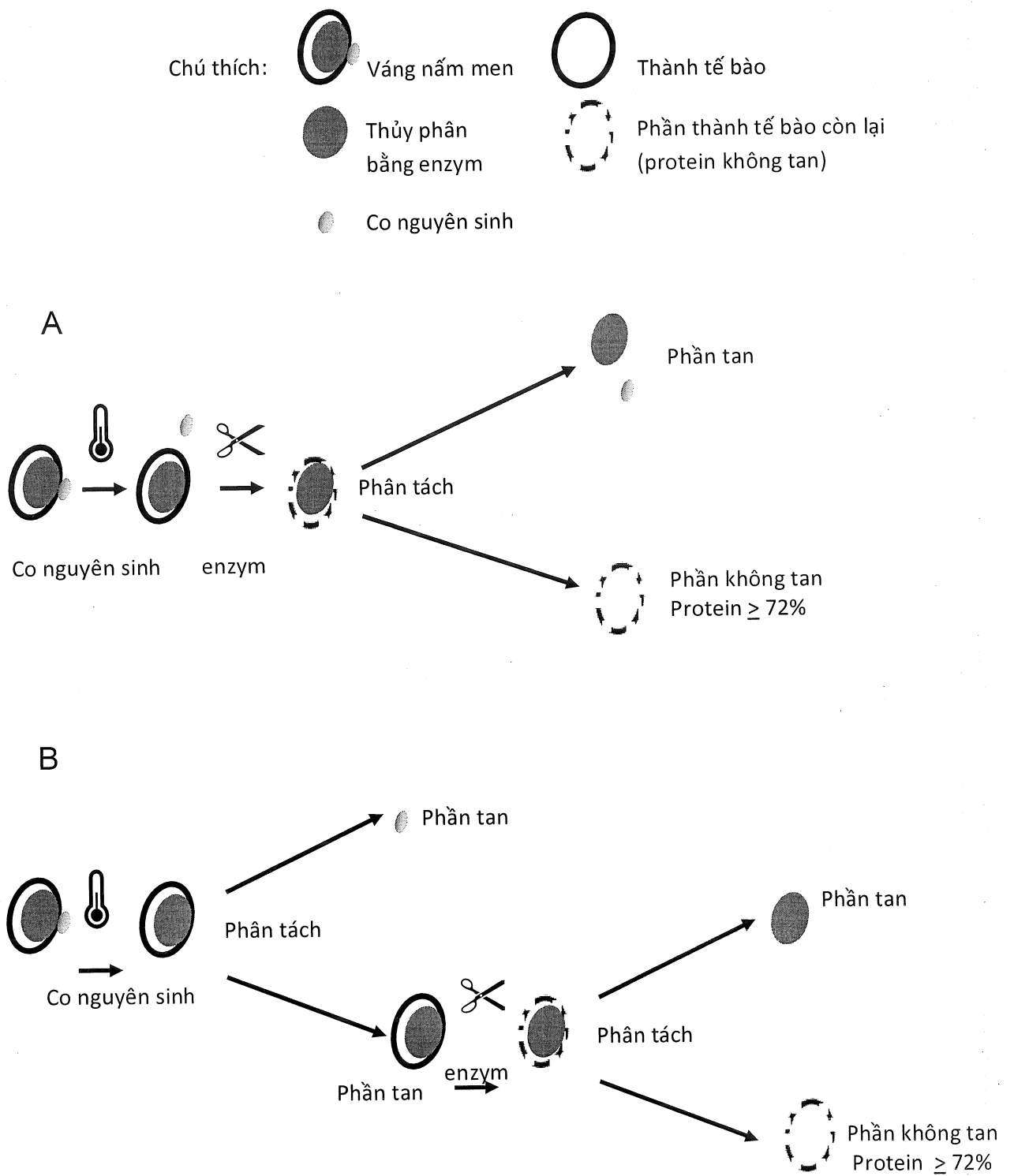
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phần không tan thu được từ bước d) được xử lý với etanol, dung môi hoặc CO₂ siêu tới hạn để loại bỏ lipid và tăng hàm lượng protein thực lên 80%.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó váng

nấm men được sử dụng tại bước a) có chứa nấm men giàu selen.

1/2

Fig. 1



2/2

Fig. 2

