



(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)



1-0053256

(51)⁷ C12N 9/88

(13) B

(21) 1-2017-04594

(22) 18/05/2016

(86) PCT/US2016/033028 18/05/2016

(87) WO/2016/191169 01/12/2016

(30) 62/165,671 22/05/2015 US; 62/166,610 26/05/2015 US; 62/168,406 29/05/2015 US

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/03/2018 360A

(73) International N&H Denmark ApS (DK)

Parallelvej 16, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark

(72) CRAMER, Jacob Flyvholm (DK); JENSEN, Lene Bojsen (DK); KELLETT-SMITH, Anja Hemmingsen (DK); BLADT, Tove (DK); LEE, Sang-Kyu (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG HOẠT TÍNH VÀ/HOẶC ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA ENZYM AXETOLACTAT ĐECARBOXYLAZA (ALDC), VÀ MÔI TRƯỜNG LÊN MEN VÀ/HOẶC MÔI TRƯỜNG Ủ CHÍN BIA VÀ/HOẶC RƯỢU CHỨA ENZYM ALDC NÀY

(21) 1-2017-04594

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp, hợp phần, thiết bị và bộ kit có chứa enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của enzym ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp, thiết bị, hợp phần và bộ kit để sử dụng ion kim loại để làm tăng độ ổn định và/hoặc hoạt tính, và còn có thể được sử dụng để thu hồi các enzym từ vi sinh vật với hiệu suất được cải thiện. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê chứa chế phẩm chứa enzym ALDC này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC), và môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê chứa chế phẩm chứa enzym ALDC này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Điaxetyl đôi khi là sản phẩm phụ không mong muốn của các quy trình lên men các chất chứa hydrat cacbon, ví dụ hèm rượu hoặc nước nho. Sự tạo thành điaxetyl là bất lợi nhất vì nó có mùi mạnh và khó chịu và trong trường hợp sản xuất bia, ngay cả lượng nhỏ của điaxetyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,10 đến 0,15 mg/lít cũng có ảnh hưởng không tốt đến hương và vị của bia. Trong quá trình ủ chín bia, điaxetyl được chuyển hóa thành axetoin bởi reductaza trong các tế bào nấm men. Axetoin chấp nhận được về hương và vị trong bia với nồng độ lớn hơn nhiều so với điaxetyl.

Axetolactat decarboxylaza (ALDC) cũng có thể được sử dụng làm enzym để ngăn ngừa sự tạo thành điaxetyl. α -axetolactat có thể được chuyển hóa thành axetoin bằng cách bổ sung enzym ALDC trong quá trình lên men. Tuy nhiên, ALDC có thể không ổn định ở điều kiện lên men, đặc biệt là điều kiện lên men hèm rượu có hàm lượng mạch nha thấp.

Mục đích của sáng chế là đề xuất enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của enzym ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp phần và quy trình dùng cho enzym ALDC.

Các khía cạnh và phương án của hợp phần và phương pháp này được nêu trong các đoạn được đánh số riêng rẽ sau đây.

1. Hợp phần có chứa enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC) và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM.
2. Hợp phần theo mục 1, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.
3. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM.
4. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.
5. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó enzym ALDC là dẫn xuất ALDC.
6. Hợp phần theo mục 5, trong đó dẫn xuất ALDC là enzym ALDC được xử lý bằng glutaraldehyt.
7. Hợp phần theo mục 6, trong đó enzym ALDC được xử lý bằng glutaraldehyt ở nồng độ tương ứng với từ khoảng 0,1 đến khoảng 5 g glutaraldehyt cho mỗi gam enzym ALDC tinh khiết.
8. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.
9. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.
10. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có

liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

11. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis* DX, hoặc *Bacillus licheniformis*.

12. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó enzym ALDC là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

13. Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

14. Sử dụng Hợp phần theo mục bất kỳ nêu trên trong quá trình lên men (như lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê).

15. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM. Phương pháp theo đoạn 15 để làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong hợp phần có chứa ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào hợp phần sao cho kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM.

16. Phương pháp theo đoạn 15, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM ; hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

17. Phương pháp theo đoạn 15 hoặc 16, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM.

18. Phương pháp theo đoạn 15 hoặc 16, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 5 mM. Phương pháp theo đoạn 15 hoặc 16, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn trong hợp phần.

19. Phương pháp theo đoạn 15, trong đó kẽm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy dưới dạng chất bổ sung trong quá trình sản xuất enzym ALDC bởi tế bào chủ sản xuất ALDC. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào môi trường nuôi cấy dưới dạng chất bổ sung trong quá trình sản xuất enzym ALDC bởi tế bào chủ sản xuất ALDC.

20. Phương pháp theo đoạn 19, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM.

21. Phương pháp theo đoạn 20, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM .

22. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 19-21, trong đó tế bào chủ là tế bào chủ *Bacillus*.

23. Phương pháp theo đoạn 22, trong đó tế bào chủ *Bacillus* là *Bacillus subtilis*.

24. Phương pháp theo đoạn 15, trong đó kẽm được bổ sung trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín trong quá trình lên men đồ uống (như lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê). Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín trong quá trình lên men đồ uống (như lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê).

25. Phương pháp theo đoạn 24, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM ; hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM .

26. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 24, 25 và đoạn này, trong đó kẽm được bổ sung dưới dạng hợp phần có chứa ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 24, 25 và đoạn này, trong đó kẽm được bổ sung dưới dạng hợp phần có chứa ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

27. Môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM; tốt hơn là môi trường nuôi cấy này có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC.

28. Môi trường nuôi cấy theo đoạn 27, có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM .

29. Môi trường nuôi cấy theo đoạn 27, trong đó kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 60 μM đến khoảng 150 μM .

30. Môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê có chứa enzym ALDC và kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM. Môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê có chứa hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm trong đó hợp phần này có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, tốt hơn là từ 1 μM đến khoảng 200 mM.

31. Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn 30, trong đó hợp phần này có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , tốt hơn là từ 1 μM đến khoảng 300 μM . Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn 30, có chứa trong đó hợp phần này có chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn 30 và đoạn này, trong đó kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng

20 mM, như từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn 30 hoặc đoạn này, trong đó kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

32. Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn 30 hoặc 31, trong đó hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

33. Môi trường lên men và/hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 30-32, còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

34. Hợp phần có chứa enzym ALDC, trong đó enzym ALDC nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

35. Hợp phần theo mục 34, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX*, hoặc *Bacillus licheniformis*.

36. Hợp phần theo mục 34, trong đó enzym ALDC là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

37. Hợp phần theo mục bất kỳ trong số các đoạn 34-36, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

38. Hợp phần theo mục bất kỳ trong số các đoạn 34-37, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, tốt hơn là từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM. Hợp phần theo mục bất kỳ trong số các đoạn 34-37, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1

hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

39. Phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và kẽm trong quá trình sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , tốt hơn là từ 1 μM đến khoảng 300 μM . Phương pháp theo đoạn 39 để sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và bổ sung kẽm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê trong quá trình sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê này sao cho kẽm có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM .

40. Phương pháp theo đoạn 39, trong đó kẽm có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 50 μM . Phương pháp theo đoạn 39, trong đó kẽm có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM .

41. Phương pháp theo đoạn 39, trong đó kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Phương pháp theo đoạn 39, trong đó kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn. Phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê trong quá trình sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê này trong đó (i) kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, tốt hơn là khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM; hoặc (ii) tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC

trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

42. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-41, trong đó enzym ALDC và kẽm được bổ sung trong quá trình lên men hoặc quá trình ủ chín.

43. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-42, trong đó enzym ALDC được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

44. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-43, trong đó enzym ALDC được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

45. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-44, trong đó hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

46. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-45, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX*, hoặc *Bacillus licheniformis*.

47. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-45, trong đó enzym ALDC là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

48. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 39-45, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

49. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, tốt hơn là từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM. Phương pháp theo đoạn 49 để làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong hợp phần có chứa ALDC, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, tốt hơn là từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM.

50. Phương pháp theo đoạn 49, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 165 pm.

51. Phương pháp theo đoạn 50, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 150 pm.

52. Phương pháp theo đoạn 51, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 142 pm đến khoảng 146 pm.

53. Phương pháp theo đoạn 49, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng.

54. Phương pháp theo đoạn 53, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} .

55. Phương pháp theo đoạn 54, trong đó ion kim loại là Zn^{2+} .

56. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 49-55, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX*, hoặc *Bacillus licheniformis*.

57. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 49-55, trong đó enzym ALDC là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

58. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 49-55, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

59. Hợp phần có chứa enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC) và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, tốt hơn là từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM.

60. Hợp phần theo mục 59, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 165 pm.

61. Hợp phần theo mục 59, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 150 pm.

62. Hợp phần theo mục 61, trong đó bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 142 pm đến khoảng 146 pm.

63. Hợp phần theo mục 59, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng.

64. Hợp phần theo mục 63, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} .

65. Hợp phần theo mục 64, trong đó ion kim loại là Zn^{2+} .

66. Phương pháp phân hủy axetolactat bao gồm bước xử lý cơ chất bằng enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM. Phương pháp theo đoạn 66 để phân hủy axetolactat bao gồm bước xử lý cơ chất bằng hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại sao cho ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM. Tốt hơn, là cơ chất nêu trên là cơ chất chứa hydrat cacbon như hèm rượu hoặc nước trái cây. Tốt hơn là, cơ chất nêu trên là môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín.

67. Phương pháp theo đoạn 66, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

68. Phương pháp theo đoạn 66, trong đó ion kim loại có mặt trong cơ chất nêu trên (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM .

69. Phương pháp theo đoạn 66, trong đó ion kim loại và ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó ion kim loại này có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Phương pháp theo đoạn 66, trong đó ion kim loại và ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

70. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-69, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng.

71. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-70, trong đó ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} .

72. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-71, trong đó ion kim loại là Zn^{2+} .

73. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-72, trong đó cơ chất được xử lý trong quá trình lên men hoặc quá trình ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

74. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-72, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX*, hoặc *Bacillus licheniformis*.

75. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-72, trong đó enzym ALDC là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

76. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn 66-72, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc điểm và ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết sau đây, phần mô tả chi tiết này đưa ra các phương án minh họa, trong đó các nguyên lý của sáng chế được sử dụng, và các hình vẽ kèm theo:

Hình 1 thể hiện bản đồ plasmit của *alrA(CB)RIHI-aldB* để biểu hiện Axetolactat Decarboxylaza, *aldB*

Hình 2 thể hiện đồ thị mô tả hoạt tính của ALDC đối với 0 mM kẽm so với nồng độ của kẽm tính bằng mM.

Hình 3 thể hiện SDS-PAGE với các mẫu *aldB* chứa các nồng độ khác nhau của ZnSO_4 . Gel A - Làn 1) Chất chỉ thị khối lượng phân tử; Làn 2-7) BSA chuẩn; Làn 8-9) *AldB* với 0 mM ZnSO_4 ; Làn 10-11) *AldB* với 0,25 mM ZnSO_4 ; Làn 12-13) *AldB* với 0,5 mM ZnSO_4 ; Làn 14-15) *AldB* với 1,0 mM ZnSO_4 ; Làn 16-17) *AldB* với 2 mM

ZnSO₄; Làn 18-19) AldB với 5 mM ZnSO₄; Làn 20-21) AldB với 7,5 mM ZnSO₄; Làn 22-23) AldB với 10 mM ZnSO₄ và Làn 24-25) AldB với 20 mM ZnSO₄. Gel B - Làn 1) Chất chỉ thị khối lượng phân tử; Làn 2-7) BSA chuẩn; Làn 8-11) AldB với 0 mM ZnSO₄; Làn 12-15) AldB với 20 mM ZnSO₄; Làn 16-17) AldB với 40 mM ZnSO₄; Làn 18-19) AldB với 60 mM ZnSO₄; Làn 20-21) AldB với 80 mM ZnSO₄; Làn 22-23) AldB với 100 mM ZnSO₄ and Làn 24-25) AldB với 120 mM ZnSO₄.

Hình 4 thể hiện SDS-PAGE với sự tinh chế aldB được sản xuất trong *B. subtilis*. Làn 1) men aldB thô 2-3) aldB được tinh chế từ Source 15Q. Chất chỉ thị khối lượng phân tử được thể hiện ở bên trái và ở giữa làn 1 và 2.

Hình 5 thể hiện sự gia tăng diketone kế cận (VDK) trong quá trình lên men dựa trên mạch nha trong sự có mặt hoặc không có mặt của biến thể enzym aldB 0,03 U/ml hèm rượu với hoạt tính riêng khác nhau: A) 919 U/mg, B) 1103 U/mg và C) 1552 U/mg aldB. Sự gia tăng VDK (tổng của điaxetyl và 2,3 pentandion) được theo dõi trong 7 ngày lên men ở nhiệt độ 14°C. Giá trị VDK trung bình được tính toán từ các mẫu bản sao và các nhãn được thể hiện dưới dạng phần cài xen trên hình.

Hình 6 thể hiện sự gia tăng VDK trong sự có mặt enzym aldB (0,04 U/mL hèm rượu) trong quá trình lên men dựa trên mạch nha với các mức Zn²⁺ khác nhau trong hèm rượu (xem các nhãn). Sự gia tăng VDK (tổng của điaxetyl và 2,3-pentandion) được theo dõi trong 7 ngày lên men ở nhiệt độ 14°C. Giá trị VDK trung bình được tính toán từ các mẫu bản sao và các nhãn được thể hiện dưới dạng phần cài xen trên hình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp, hợp phần, thiết bị và bộ kit có chứa enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của enzym ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp, thiết bị, hợp phần và bộ kit để sử dụng ion kim loại để làm tăng độ ổn định và/hoặc hoạt tính, và, tùy ý, còn có thể được sử dụng để thu hồi các enzym (ví dụ enzym ALDC) từ vi sinh vật với hiệu suất được cải thiện.

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như được hiểu thông thường bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), và Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper

Perennial, NY (1991) cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cuốn từ điển chung về nhiều thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này.

Sáng chế không bị giới hạn bởi các phương pháp và vật liệu nêu làm ví dụ bộc lộ trong bản mô tả này, và phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm các phương án của sáng chế. Các khoảng giá trị số bao gồm cả các số xác định khoảng này. Trừ khi được quy định khác đi, trình tự axit nucleic bất kỳ được viết từ trái sang phải theo hướng từ 5' đến 3'; trình tự axit amin được viết từ trái sang phải theo hướng amino đến carboxy, một cách tương ứng.

Các đề mục được đưa ra ở đây không phải là sự giới hạn các khía cạnh hoặc phương án khác nhau của sáng chế, các khía cạnh hoặc phương án này có thể có được nhờ sự tham chiếu đến toàn bộ bản mô tả. Do đó, các thuật ngữ được định nghĩa ngay dưới đây được xác định một cách đầy đủ hơn nhờ sự tham chiếu đến toàn bộ bản mô tả.

Cần phải lưu ý rằng như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm, các dạng số ít "một" bao gồm cả tham chiếu số nhiều trừ khi được nêu khác đi. Do đó, ví dụ, viện dẫn đến "proteaza" bao gồm nhiều enzym như vậy và viện dẫn đến "thức ăn" bao gồm viện dẫn đến một hoặc nhiều thức ăn và các dạng tương đương của nó đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và vân vân.

Các tài liệu công bố được bàn luận ở đây được đưa ra chỉ vì các tài liệu này được bộc lộ trước ngày nộp đơn của đơn sáng chế này. Không có gì ở đây được hiểu là sự thừa nhận rằng các tài liệu công bố này cấu thành tình trạng kỹ thuật đối với các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Tất cả các patent và tài liệu công bố viện dẫn ở đây đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

ALDC

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của enzym ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật. Các thuật ngữ "độ ổn định tốt hơn" và "độ ổn định được làm tăng" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ enzym ALDC mà hoạt tính ALDC của nó được duy trì trong khoảng thời gian dài hơn khi có mặt ion kim loại (như Zn^{2+}) khi so

với hoạt tính ALDC của enzym khi không có ion kim loại. Các thuật ngữ "hoạt tính tốt hơn" và "hoạt tính tăng" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ enzym ALDC có hoạt tính ALDC tăng khi có mặt ion kim loại (như Zn^{2+}) khi so với hoạt tính ALDC của enzym khi không có ion kim loại.. Thuật ngữ "được cải thiện" liên quan đến hiệu suất của enzym ALDC chỉ sự tăng hoạt tính ALDC được sản xuất bởi vi sinh vật chủ trong sự có mặt ion kim loại (như Zn^{2+}) so với hoạt tính ALDC được sản xuất bởi vi sinh vật chủ khi không có ion kim loại. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, ion kim loại (như Zn^{2+}) có thể được bổ sung trong và/hoặc sau quá trình nuôi cấy (ví dụ sản xuất ALDC) để làm tăng độ ổn định và/hoặc làm tăng hoạt tính và/hoặc để làm tăng hiệu suất của enzym ALDC. Các thuật ngữ "tế bào chủ", "vi sinh vật chủ", "chúng" và "vi sinh vật" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

Axetolactat decarboxylaza (ALDC) là enzym thuộc họ carboxy lyaza, chịu trách nhiệm phân cắt liên kết cacbon-cacbon. Axetolactat decarboxylaza xúc tác sự biến đổi 2-axetolactat (còn được biết là 2-hydroxy-2-metyl-3-oxobutanoat) thành 2-axetoin và giải phóng CO_2 . Các thuật ngữ "ALDC" và "enzym ALDC" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

Enzym axetolactat decarboxylaza xúc tác phản ứng enzym thuộc phân loại EC 4.1.1.5 (hoạt tính axetolactat decarboxylaza) và ID từ khóa của Bản đồ ngữ nghĩa gen (GO) là GO: 0047605. ID từ khóa GO chỉ rõ rằng protein bất kỳ, được đặc trưng là có từ khóa GO có liên quan này, mã hóa enzym với hoạt tính axetolactat decarboxylaza xúc tác.

Các gen axetolactat decarboxylaza khác nhau (như *alsD* hoặc *aldB*), mã hóa enzym axetolactat decarboxylaza, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.. Gen *alsD*, mã hóa enzym ALDC, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus subtilis*. Gen *aldB*, mã hóa enzym ALDC, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus brevis*. Gen *alsD*, mã hóa enzym ALDC, có thể thu được từ hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus licheniformis*. Số truy cập UNIPROT Q65E52.1 là ví dụ về enzym ALDC. Số truy cập UNIPROT Q65E52.1 là ví dụ về enzym ALDC thu được hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus licheniformis*. Ví dụ về gen axetolactat decarboxylaza bao gồm, nhưng không giới hạn ở gi|375143627|ref|YP_005006068.1| axetolactat decarboxylaza [*Niastella koreensis* OR20-10]; gi|361057673|gb|AEV96664.1| axetolactat decarboxylaza [*Niastella koreensis* OR20-

10]; gi|218763415|gb|ACL05881.1| axetolactat đecarboxylaza [*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01]; gi|220909520|ref|YP_002484831.1| axetolactat đecarboxylaza [*Cyanothece* sp. PCC 7425]; gi|218782031|ref|YP_002433349.1| axetolactat đecarboxylaza [*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01]; gi|213693090|ref|YP_002323676.1| axetolactat đecarboxylaza [*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 = JCM 1222]; gi|189500297|ref|YP_001959767.1| axetolactat đecarboxylaza [*Chlorobium phaeobacteroides* BS1]; gi|189423787|ref|YP_001950964.1| axetolactat đecarboxylaza [*Geobacter lovleyi* SZ]; gi|172058271|ref|YP_001814731.1| axetolactat đecarboxylaza [*Exiguobacterium sibiricum* 255-15]; gi|163938775|ref|YP_001643659.1| axetolactat đecarboxylaza [*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4]; gi|158522304|ref|YP_001530174.1| axetolactat đecarboxylaza [*Desulfococcus oleovorans* Hxd3]; gi|57371670|ref|YP_001479659.1| axetolactat đecarboxylaza [*Serratia proteamaculans* 568]; gi|150395111|ref|YP_001317786.1| axetolactat đecarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|150394715|ref|YP_001317390.1| axetolactat đecarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|146311679|ref|YP_001176753.1| axetolactat đecarboxylaza [*Enterobacter* sp. 638]; gi|109900061|ref|YP_663316.1| axetolactat đecarboxylaza [*Pseudoalteromonas atlantica* T6c]; gi|219866131|gb|ACL46470.1| axetolactat đecarboxylaza [*Cyanothece* sp. PCC 7425]; gi|213524551|gb|ACJ53298.1| axetolactat đecarboxylaza [*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 = JCM 1222]; gi|189420046|gb|ACD94444.1| axetolactat đecarboxylaza [*Geobacter lovleyi* SZ]; gi|158511130|gb|ABW68097.1| axetolactat đecarboxylaza [*Desulfococcus oleovorans* Hxd3]; gi|157323434|gb|ABV42531.1| axetolactat đecarboxylaza [*Serratia proteamaculans* 568]; gi|145318555|gb|ABP60702.1| axetolactat đecarboxylaza [*Enterobacter* sp. 638]; gi|1499475631|gb|ABR53499.1| axetolactat đecarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|149947167|gb|ABR53103.1| axetolactat đecarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|163860972|gb|ABY42031.1| Axetolactat đecarboxylaza [*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4]; gi|109702342|gb|ABG42262.1| Axetolactat đecarboxylaza [*Pseudoalteromonas atlantica* T6c]; gi|189495738|gb|ACE04286.1| axetolactat đecarboxylaza [*Chlorobium phaeobacteroides* BS1];

gi|171990792|gb|ACB61714.1| axetolactat decarboxylaza [*Exiguobacterium sibiricum* 255-15]; gi|223932563|ref|ZP_03624564.1| axetolactat decarboxylaza [*Streptococcus suis* 89/1591]; gi|194467531|ref|ZP_03073518.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus reuteri* 100-23]; gi|223898834|gb|EEF65194.1| acetolactate decarboxylase [*Streptococcus suis* 89/1591]; gi|194454567|gb|EDX43464.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus reuteri* 100-23]; gi|384267135|ref|YP_005422842.1| axetolactat decarboxylaza [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]; gi|375364037|ref|YP_005132076.1| axetolactat decarboxylaza [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]; gi|34079323|ref|YP_004758694.1| axetolactat decarboxylaza [*Corynebacterium variabile* DSM 44702]; gi|336325119|ref|YP_004605085.1| axetolactat decarboxylaza [*Corynebacterium resistens* DSM 45100]; gi|148269032|ref|YP_001247975.1| axetolactat decarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|148268650|ref|YP_001247593.1| axetolactat decarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|1485433721|ref|YP_001270742.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus reuteri* DSM 20016]; gi|380500488|emb|CCG51526.1| axetolactat decarboxylaza [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]; gi|371570031|emb|CCF06881.1| axetolactat decarboxylaza [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]; gi|340533141|gb|AEK35621.1| axetolactat decarboxylaza [*Corynebacterium variabile* DSM 44702]; gi|336101101|gb|AE108921.1| axetolactat decarboxylaza [*Corynebacterium resistens* DSM 45100]; gi|148530406|gb|ABQ82405.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus reuteri* DSM 20016]; gi|147742101|gb|ABQ50399.1| axetolactat decarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|147741719|gb|ABQ50017.1| axetolactat decarboxylaza [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|392529510|ref|ZP_10276647.1| axetolactat decarboxylaza [*Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586]; gi|366054074|ref|ZP_09451796.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus suebicus* KCTC 3549]; gi|339624147|ref|ZP_08659936.1| axetolactat decarboxylaza [*Fructobacillus fructosus* KCTC 3544]; and gi|336393727|ref|ZP_08575126.1| axetolactat decarboxylaza [*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* KCTC 3535]. UNIPROT Accession No.

P23616.1 (Diderichsen et al., J Bacteriol. (1990) 172(8): 4315) là ví dụ về enzym ALDC. Số truy cập UNIPROT P23616.1 là ví dụ về enzym ALDC thu được hoặc có khả năng thu được từ *Bacillus brevis*. Mỗi trình tự có liên quan đến các số truy cập trên đây được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến enzym ALDC từ *Lactobacillus casei* (Godtfredsen 1984), *Brevibacterium acetylicum* (Oshiro, 1989), *Lactococcus lactis* (Vincent Phalip 1994), *Leuconostoc lactis* (O sullivan, 2001), *Enterobacter aerogenes* (Blomquist, 1993), *Bacillus subtilis* (Renna, 1993), *Bacillus brevis* (Svendsen, 1989) và *Lactococcus lactis DX* (Yuxing, 2014). Theo một số phương án, enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX*, hoặc *Bacillus licheniformis*. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "enzym ALDC là từ" chỉ enzym ALDC thu được hoặc có khả năng thu được từ.

Cần phải hiểu rằng enzym ALDC thích hợp bất kỳ, tức là ALDC được sản xuất từ vi sinh vật bất kỳ, hoạt tính của nó tùy thuộc vào ion kim loại, có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, ALDC được sử dụng trong phương pháp và hợp phần được mô tả trong bản mô tả này là ALDC từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

Hoạt tính ALDC của hợp phần enzym theo sáng chế được xác định bởi thử nghiệm ALDC như được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm chuẩn được tiến hành ở độ pH 6,0, và nó có thể được thực hiện ở các giá trị độ pH và nhiệt độ khác nhau để mô tả đặc điểm và đặc tính bổ sung của enzym.

Một đơn vị hoạt tính ALDC được định nghĩa là lượng enzym sản xuất 1 μmol axetoin cho mỗi phút trong các điều kiện của thử nghiệm (ví dụ, pH 6,0 (hoặc như được chỉ rõ) và nhiệt độ 30 °C).

Theo một số phương án, ALDC là dẫn xuất ALDC. Theo một số phương án, dẫn xuất ALDC được đặc trưng ở chỗ ALDC trong môi trường chứa nước được xử lý hoặc đã được xử lý bằng glutaraldehyt. Theo một số phương án, ALDC được xử lý hoặc đã được xử lý bằng glutaraldehyt với nồng độ tương ứng với từ 0,1 đến 5 g

glutaraldehyt cho mỗi gam protein ALDC tinh khiết, tốt hơn là tương ứng với từ 0,25 đến 2 g glutaraldehyt cho mỗi gam protein ALDC tinh khiết.

Theo một số phương án, enzym ALDC có chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến enzym thể hiện hoạt tính ALDC, enzym này có chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, enzym ALDC được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 6 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, enzym này có giá trị tối ưu nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5-80 °C, như nằm trong khoảng từ 5-40 °C hoặc 15-80 °C, như trong khoảng 20-80 °C, như trong khoảng 5-15 °C, 10-40 °C, 10-50 °C, 15-20 °C, 45-65 °C, 50-65 °C, 55-65 °C hoặc 60-80 °C. Theo một số phương án, enzym này có giá trị tối ưu nhiệt độ khoảng 60 °C.

Theo một số phương án, enzym có tổng số axit amin ít hơn 350, như ít hơn 340, như ít hơn 330, như ít hơn 320, như ít hơn 310, như ít hơn 300 axit amin, như nằm trong khoảng từ 200 đến 350, như nằm trong khoảng từ 220 đến 345 axit amin.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của enzym có ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười phần thể axit amin so với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của enzym có tối đa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười phần thể axit amin so với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, enzym có chứa trình tự axit amin được xác định bởi bất kỳ trong số SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, hợp phần, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa bất kỳ một hoặc nhiều enzym khác. Theo một số phương án, một hoặc nhiều enzym khác này được chọn từ danh sách gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, hợp phần, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, hợp phần, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, hợp phần, môi trường và phương pháp theo sáng chế có chứa enzym thể hiện hoạt tính ALDC, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, enzym thể hiện hoạt tính ALDC là enzym có chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, enzym thể hiện hoạt tính ALDC được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó.

Ion kim loại

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần có chứa enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần có chứa enzym ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật với hiệu suất được cải thiện.

Ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc xử lý hợp phần ALDC bằng một số ion kim loại nhất định ở các nồng độ nhất định tạo ra enzym ALDC có độ ổn định và/hoặc hoạt tính tốt hơn, và, tùy ý, cải thiện hiệu suất của hoạt tính ALDC mà có thể được thu hồi từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 255 pm. Theo một số phương án, bán kính

nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 165 pm. Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 140 pm đến khoảng 150 pm. Theo một số phương án, bán kính nguyên tử đối với ion kim loại nằm trong khoảng từ khoảng 142 pm đến khoảng 146 pm.

Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Thuật ngữ "kẽm" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể thay thế lẫn nhau với thuật ngữ " Zn^{2+} ". Thuật ngữ "kim loại" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "ion kim loại". Thuật ngữ "kim loại" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ hợp chất có chứa kim loại được chọn từ nhóm bao gồm kẽm, magie, mangan, coban, đồng, bari, canxi và sắt; hợp chất có chứa các kim loại này là nguồn ion tương ứng. Thuật ngữ "kẽm" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hợp chất có chứa kẽm, các hợp chất này là nguồn ion Zn^{2+} . Kẽm sulfat (ZnSO_4) là ví dụ về kẽm như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Zn^{2+} . Magie sulfat (MgSO_4) là ví dụ về magie như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Mg^{2+} . Mangan(II) sulfat (MnSO_4) là ví dụ về mangan như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Mn^{2+} . Coban(II)clorua (CoCl_2) là ví dụ về coban như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Co^{2+} . Đồng(II) sulphat (CuSO_4) là ví dụ về đồng như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Cu^{2+} . Bari sulfat (BaSO_4) là ví dụ về bari như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Ba^{2+} . Canxi sulfat (CaSO_4) là ví dụ về canxi như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Ca^{2+} . Sắt(II) sulfat (FeSO_4) là ví dụ về sắt như được đề cập ở đây và là ví dụ về nguồn ion Fe^{2+} .

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng ion kim loại như Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} làm tăng độ ổn định của enzym ALDC trong các hợp phần khác nhau (xem phần các Ví dụ), và cũng cải thiện hiệu suất thu hồi từ vi sinh vật khi ion kim loại được sử dụng trong quá trình sản xuất enzym trong môi trường nuôi cấy. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần làm tăng hiệu suất

thu hồi, độ ổn định và/hoặc hoạt tính của enzym ALDC mà sau đó có thể được sử dụng, ví dụ, để sản xuất sản phẩm lên men như trong quá trình ủ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp phần có chứa enzym ALDC với độ ổn định và/hoặc hoạt tính tăng.

Theo một số phương án, enzym ALDC có hoạt tính riêng ít nhất khoảng 900 đơn vị cho mỗi mg protein (U/mg), ít nhất khoảng 1000 U/mg, ít nhất khoảng 1500 U/mg, ít nhất khoảng 2000 U/mg, ít nhất khoảng 3000 U/mg ít nhất khoảng 5000 U/mg, ít nhất khoảng 6000 U/mg, ít nhất khoảng 7000 U/mg, ít nhất khoảng 8000 U/mg, ít nhất khoảng 8500 U/mg, ít nhất khoảng 9000 U/mg, ít nhất khoảng 9500 U/mg, hoặc ít nhất khoảng 10000 U/mg như được xác định bởi các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, enzym ALDC có hoạt tính ALDC nằm trong khoảng từ khoảng 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein (U/mg), từ khoảng 1000 đến 2500 U/mg, hoặc từ khoảng 1500 đến 2500 U/mg như được xác định bởi các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, hợp phần ALDC theo sáng chế có chứa enzym ALDC với hoạt tính ALDC ít nhất khoảng 900 đơn vị cho mỗi gam sản phẩm, ít nhất khoảng 1000 U/g, ít nhất khoảng 1500 U/g, ít nhất khoảng 2000 U/g, ít nhất khoảng 3000 U/g ít nhất khoảng 5000 U/g, như ít nhất khoảng 6000 U/g, như ít nhất khoảng 7000 U/g, như ít nhất khoảng 8000 U/g, như ít nhất khoảng 8500 U/g, như ít nhất khoảng 9000 U/g, như ít nhất khoảng 9500 U/g, như ít nhất khoảng 10000 U/g như được xác định trong các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, hoạt tính ALDC khác được sử dụng, ví dụ, tùy thuộc vào các yêu cầu về điều kiện và hàm lượng axetolactat, ví dụ cho quá trình ủ. Theo một số phương án, hợp phần ALDC theo sáng chế có chứa enzym ALDC với hoạt tính ALDC ít nhất khoảng 8000 U/g.

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 100 μM , hoặc khoảng 15 μM đến khoảng

50 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} .

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 100 μM , hoặc khoảng 15 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến

khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 300 μ M, như từ khoảng 6 μ M đến khoảng 300 μ M, hoặc từ khoảng 6 μ M đến khoảng 25 μ M. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μ M đến khoảng 150 μ M hoặc từ khoảng 60 μ M đến khoảng 150 μ M. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μ M đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μ M đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM.

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 3 mM, hoặc từ khoảng 0,75 mM đến khoảng 4mM, hoặc từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 0,25 mM đến khoảng 7,5 mM, hoặc từ khoảng 0,1 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc 100:1, hoặc 150:1, hoặc 200:1, hoặc 250:1, hoặc 500:1. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 2:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 5:1 hoặc cao hơn. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 10:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 20:1 hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 30:1 hoặc lớn hơn.

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym bằng 60:1 hoặc lớn hơn. Nồng độ mol của, ví dụ, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} hoặc ion kim loại khác trong dung dịch có thể được xác định bằng phép đo quang phổ phát xạ nguyên tử plasma ghép cặp cảm ứng (ICP-OES) hoặc các kỹ thuật tương tự. Nồng độ mol của enzym ALDC có thể được xác định bằng cách sử dụng hệ SDS-PAGE tiêu chuẩn (như được mô tả trong các ví dụ) và trình tự axit amin.

Theo một số phương án, enzym ALDC là dẫn xuất ALDC. Theo một số phương án, dẫn xuất ALDC là enzym ALDC được xử lý bằng glutaraldehyt. Theo một số phương án, enzym ALDC được xử lý bằng glutaraldehyt ở nồng độ tương ứng với từ khoảng 0,1 đến khoảng 5 g glutaraldehyt cho mỗi gam enzym ALDC tinh khiết.

Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Do đó, theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC, trong đó enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, và hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, hợp phần có chứa enzym ALDC hoặc dẫn xuất ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, và hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, hợp phần enzym ALDC còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, hợp phần enzym ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men và/hoặc ủ chín của quy trình điều chế đồ uống, ví dụ, bia và rượu vang, để làm giảm mức *điaxetyl*. Các thuật ngữ "Hợp phần enzym ALDC", "Hợp phần có chứa enzym ALDC" và "Hợp phần có chứa ALDC" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hợp phần có chứa enzym ALDC. Hợp phần này có thể ở dạng dung dịch. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "Hợp phần enzym ALDC" và "Hợp phần có chứa ALDC" loại trừ lẫn nhau với môi trường (như môi trường nuôi cấy, môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín) có chứa vi sinh vật biểu hiện ALDC và/hoặc có khả năng biểu hiện ALDC khi được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện enzym này. Ví dụ về hợp phần enzym ALDC và hợp phần có chứa ALDC bao gồm hợp phần có chứa ALDC ở dạng được tinh chế. ALDC có thể được tinh chế từ môi trường có chứa vi sinh vật có khả năng biểu hiện ALDC trong đó môi trường này được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của ALDC. Thuật ngữ "được tinh chế" nghĩa là ALDC có mặt ở mức cao. Tốt hơn là, ALDC là thành phần chủ yếu có mặt trong hợp phần. Tốt hơn là, ALDC có mặt ở mức ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% hoặc ít nhất khoảng 98%, mức này được xác định trên cơ sở khối lượng khô/khối lượng khô so với tổng hợp phần đang xem xét. Theo một số phương án, hợp phần enzym ALDC còn có chứa ion kim loại như kẽm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "đồ uống" và "sản phẩm đồ uống" bao gồm đồ uống lên men tạo bọt như bia được ủ với 100% mạch nha, bia được ủ trong nhiều kiểu thiết đặt khác nhau, rượu bia, bia "khô", bia rất ít cồn, bia nhẹ, bia có hàm lượng cồn thấp, bia thấp calo, rượu bia đen, bia đen Đức, bia đen, nặng, rượu mạch nha, bia không cồn, rượu mạch nha không cồn và các loại tương tự. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm bia không bọt và đồ uống mạch nha thay thế như đồ uống mạch nha có hương vị trái cây, ví dụ, hương vị cam chanh, như đồ uống mạch nha hương vị chanh vàng, cam, chanh cốm, hoặc quả mọng, đồ uống mạch nha hương vị rượu, ví dụ, rượu mạch nha hương vị rượu vốt-ca, rượu rum, hoặc rượu *têquila*, hoặc đồ uống mạch nha hương vị cà phê, như rượu mạch nha hương vị cà-phê-in, và các loại tương tự. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm bia được làm từ nguyên liệu thay thế khác với lúa mạch tạo mạch nha, như lúa mạch đen, ngũ cốc, yến mạch, gạo, kê, lúa mì đen, sắn, lúa miến, lúa

mạch, lúa mì và hỗn hợp của chúng. Thuật ngữ "đồ uống" hoặc "sản phẩm đồ uống" cũng bao gồm các sản phẩm lên men khác như rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê.

Bia theo truyền thống được gọi là đồ uống có cồn có nguồn gốc từ mạch nha, như mạch nha có nguồn gốc từ hạt lúa mạch, và tùy ý thành phần phụ thêm, như nguyên liệu thực vật chứa tinh bột (ví dụ hạt ngũ cốc) và tùy ý được tạo hương vị, ví dụ với hoa bia. Theo sáng chế, thuật ngữ "bia" bao gồm hèm rượu lên men bất kỳ, được sản xuất bằng cách lên men/ủ nguyên liệu thực vật chứa tinh bột, do đó cụ thể cũng bao gồm bia được sản xuất riêng từ thành phần phụ thêm, hoặc hỗn hợp bất kỳ của mạch nha và thành phần phụ thêm. Bia có thể được làm từ nhiều nguyên liệu thực vật chứa tinh bột khác nhau bởi quy trình về cơ bản giống nhau, trong đó tinh bột chủ yếu gồm homopolyme glucoza trong đó các gốc glucoza được liên kết bởi liên kết α -1, 4 hoặc α -1,6, trong đó liên kết α -1, 4 chiếm ưu thế. Bia có thể được làm từ nguyên liệu thay thế như lúa mạch đen, ngô, yến mạch, gạo, kê, lúa mì đen, sắn, lúa miến, lúa mì, lúa mạch và hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μ M đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μ M đến khoảng 500 μ M, hoặc từ khoảng 0,1 μ M đến khoảng 300 μ M, hoặc từ khoảng 1 μ M đến khoảng 300 μ M, hoặc từ khoảng 6 μ M đến khoảng 300 μ M, hoặc từ khoảng 1 μ M đến khoảng 100 μ M, hoặc từ khoảng 1 μ M đến khoảng 50 μ M, hoặc từ khoảng 6 μ M đến khoảng 50 μ M, hoặc từ khoảng 6 μ M đến khoảng 25 μ M. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μ M đến khoảng 100 mM, như khoảng 0,1 μ M đến khoảng 10 μ M, hoặc từ 1 μ M đến khoảng 100 mM, hoặc từ 1 μ M đến khoảng 10 μ M, hoặc từ 6 μ M đến khoảng 10 μ M, hoặc từ khoảng 10 μ M đến khoảng 200 μ M, hoặc khoảng 50 μ M đến khoảng 1 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 250 μ M đến khoảng 120 mM, hoặc khoảng 500 μ M đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 1 mM

đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM hoặc khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM hoặc khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, môi trường lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng

500 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 100 mM, như khoảng 0,1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 10 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 200 μM , hoặc khoảng 50 μM đến khoảng 1 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 120 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường ủ chín (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) có chứa enzym ALDC và ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein,

hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Theo một số phương án, môi trường ủ chín (ví dụ ủ chín bia và/hoặc rượu vang) còn có chứa ít nhất một enzym hoặc dẫn xuất enzym bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat reductoisomeraza, axetolactat isomeraza, amylaza, glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym tiếp cận thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym tiếp cận xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

Theo một số phương án, ion kim loại như Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và/hoặc môi trường lên men trong quá trình sản xuất và/hoặc sau quá trình sản xuất ALDC để làm tăng hiệu suất được thu hồi từ vi sinh vật.

Thuật ngữ "môi trường nuôi cấy" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường hỗ trợ sự sinh trưởng của vi sinh vật như tế bào chủ sản xuất ALDC. Ví dụ về môi trường nuôi cấy bao gồm: môi trường dựa trên chất đệm MOP với, chẳng hạn, ure làm nguồn nitơ chính và maltrin làm nguồn cacbon chính; và canh TSB. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được

chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein, hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Có thể bổ sung nguyên liệu vào hợp phần chứa enzym để cải thiện các tính chất của hợp phần. Ví dụ không giới hạn về các chất phụ gia như vậy bao gồm: muối (ví dụ, muối kiềm, muối kim loại kiềm thổ, các muối clorua bổ sung, muối sulfat, muối nitrat, muối cacbonat, trong đó ion trái dấu nêu làm ví dụ là canxi, kali, và natri), khoáng vật hoặc đất sét vô cơ (ví dụ, zeolit, cao lanh, bentonit, bột talc và/hoặc silicat), hydrat cacbon (ví dụ, sucroza và/hoặc tinh bột), sắc tố tạo màu (ví dụ, titan đioxit), thuốc diệt sinh vật (ví dụ, Rodalon®, Proxel®), chất phân tán, chất chống bọt, chất khử, chất axit, chất kiềm, chất làm ổn định enzym (ví dụ polyol như glyxerol, propylen glycol, sorbitol, muối vô cơ, đường, đường hoặc rượu đường, axit lactic, axit boric, hoặc dẫn xuất axit boric và hỗn hợp của chúng), chất ức chế enzym, chất bảo quản (ví dụ metyl paraben, propyl paraben, benzoat, sorbat hoặc các chất bảo quản khác được chúng nhận dùng trong thực phẩm) và hỗn hợp của chúng. Các tá dược có thể được sử dụng trong hợp phần, hoặc trong quá trình điều chế chúng, bao gồm maltoza, xi-rô maltoza, sucroza, glucoza (bao gồm xi-rô glucoza hoặc xi-rô glucoza khô), tinh bột được nấu sơ bộ, tinh bột được gelatin hóa, L-lactic, ascorbyl palmitat, tocopherol, lexitin, axit xitric, xitrat, phosphoric, phosphat, natri alginat, carrageenan, gôm đậu cào cào (locust bean), gôm guar, gôm xanthan, pectin, natri carboxymetylxenluloza, mono- và diglyxerit, este axit xitric của mono- và diglyxerit, sucroza este, cacbon đioxit, argon, heli, nitơ, nitơ oxit, oxy, hydro, và tinh bột natri octenylsuccinat.

Phương pháp

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện độ ổn định và/hoặc hoạt tính của enzym ALDC. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự thu hồi ALDC từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong hợp phần có chứa ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào hợp phần sao cho ion kim loại này có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200

mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 μM , hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 μM , hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào môi trường sao cho ion kim loại này có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín có chứa enzym ALDC, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung ion kim loại vào môi trường sao cho ion kim loại này có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM trong môi trường. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+}

và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} .

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong hợp phần có chứa ALDC, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào hợp phần sao cho kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc khoảng 500 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 5 mM đến khoảng 10 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC trong môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín có chứa enzym ALDC trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào môi trường sao cho kẽm có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , như từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , từ khoảng 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm vào môi trường sao cho kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong

khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM trong môi trường này. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc 100:1, hoặc 150:1, hoặc 200:1 hoặc 250:1 trong hợp phần. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC bằng 5:1 hoặc cao hơn trong hợp phần. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC bằng 10:1 hoặc lớn hơn trong hợp phần. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC bằng 20:1 hoặc lớn hơn trong hợp phần. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC bao gồm bổ sung kẽm ở tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC bằng 30:1 hoặc lớn hơn trong hợp phần.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung (ví dụ dưới dạng chất bổ sung) vào môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất enzym ALDC bởi tế bào chủ sản xuất ALDC. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 1 mM, như từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án kẽm được bổ sung (ví dụ dưới dạng chất bổ sung) vào môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất enzym ALDC này bởi tế bào chủ sản

xuất ALDC ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 25 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM , hoặc từ 60 μM đến khoảng 150 μM .

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ *Bacillus*. Theo một số phương án, tế bào chủ *Bacillus* là *Bacillus subtilis*.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình sản xuất đồ uống lên men. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, kẽm được bổ sung trong môi trường lên men trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,1 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ 1 mM đến 5 mM. Theo một số phương án, kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung trong môi trường ủ chín trong quá trình sản xuất đồ uống lên men. Theo một số phương án, ion kim loại được bổ sung môi trường ủ chín trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại

được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, kẽm được bổ sung trong môi trường ủ chín trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, kẽm được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 30 μM đến khoảng 40 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án kẽm và ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất axetoin được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp phân hủy axetolactat được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axetolactat được phân hủy thành axetoin. Các phương pháp này bao gồm bước xử lý cơ chất bằng enzym ALDC và ion kim loại, trong đó ion kim loại có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng

1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án ion kim loại và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Do đó, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước xử lý cơ chất bằng enzym ALDC và kẽm, trong đó kẽm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM, như từ 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ 6 μM đến khoảng 25 μM . Theo một số phương án, kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ 0,25 mM đến khoảng 120 mM, như từ 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án kẽm và enzym ALDC được bổ sung trong hợp phần, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong hợp phần cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1.

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất axetoin trong quá trình sản xuất đồ uống lên men được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp phân hủy axetolactat trong quá trình sản xuất đồ uống lên men được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axetolactat được phân hủy thành axetoin.

Sản phẩm lên men

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm rượu lên men có hàm lượng diacetyl thấp bằng cách lên men cơ chất chứa hydrat cacbon với vi sinh vật. Như được sử dụng trong bản mô tả này, sản phẩm rượu lên men có "hàm lượng diacetyl thấp" chỉ sản phẩm rượu lên men (ví dụ bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê) được sản xuất bằng cách lên men cơ chất chứa hydrat cacbon với hợp phần có chứa ALDC trong sự có mặt ion kim loại (như kẽm) trong đó mức diacetyl là thấp hơn khi so với rượu lên men được sản xuất bằng cách lên men cơ chất chứa hydrat cacbon với hợp phần có chứa ALDC khi không có ion kim loại (như kẽm) trong cùng điều kiện lên men (ví dụ cùng nhiệt độ và trong cùng khoảng thời gian). Ví dụ về sản phẩm rượu lên men có hàm lượng diacetyl thấp là sản phẩm rượu lên men trong đó mức diacetyl ít hơn khoảng 1 ppm và/hoặc mức diacetyl dưới khoảng 0,5 mg/l. Theo một phương án, mức diacetyl ít hơn khoảng 0,5 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,1 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,05 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,01 ppm, hoặc ít hơn khoảng 0,001 ppm. Theo một phương án, mức diacetyl khoảng ít hơn 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,01 mg/l hoặc khoảng ít hơn 0,001 mg/l.

Khi cơ chất chứa hydrat cacbon, như hèm rượu (ví dụ hèm rượu có hàm lượng mạch nha thấp) hoặc nước trái cây (như nước nho, nước táo hoặc nước lê), được lên men với nấm men hoặc các vi sinh vật khác, các quy trình khác nhau diễn ra ngoài quy trình lên men mà có thể tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn, ví dụ, tạo ra diacetyl có mùi mạnh và khó chịu ngay cả ở nồng độ rất thấp. Đồ uống có cồn, như bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê, do đó có thể có mùi và hương vị không chấp nhận được nếu hàm lượng diacetyl lớn hơn đáng kể giới hạn nhất định cho phép, ví dụ, trong trường hợp một số bia, hàm lượng này vào khoảng 0,1 ppm.

Việc tạo thành diacetyl cũng bất lợi trong quá trình sản xuất ethanol trên quy mô công nghiệp vì khó tách diacetyl khỏi ethanol bằng cách chưng cất. Vấn đề cụ thể nảy sinh trong quá trình điều chế ethanol tuyệt đối trong đó ethanol được loại nước bằng cách chưng cất đồng sôi với benzen. Diacetyl sẽ tích lũy trong pha benzen trong quá trình chưng cất đồng sôi, điều này có thể làm tăng hỗn hợp của diacetyl và benzen làm cho khó thu hồi benzen được sử dụng cho chưng cất đồng sôi.

Quy trình ủ bia thông thường bao gồm lên men hèm rượu với loài nấm men thích hợp, như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Saccharomyces carlsbergensis*.

Thường thì, trong quy trình ủ thông thường, quá trình lên men thường được thực hiện trong hai bước, lên men chính trong khoảng thời gian bình thường từ 5 đến 12 ngày và lên men phụ, còn được gọi là quá trình ủ chín –quá trình này có thể diễn ra trong vòng 12 tuần. Trong quá trình lên men chính, hầu hết hydrat cacbon trong hèm rượu được biến đổi thành etanol và cacbon đioxit. Quá trình ủ chín thường được thực hiện ở nhiệt độ thấp trong sự có mặt lượng ít nấm men còn lại. Mục đích của việc ủ chín là, không kể những mục đích khác, để kết tủa hợp chất có khối lượng phân tử cao, không mong muốn và để biến đổi hợp chất không mong muốn thành các hợp chất, như diol, mà không ảnh hưởng đến hương vị và mùi thơm. Ví dụ, butandiol, sản phẩm cuối cùng của sự biến đổi α -axetolactat và diacetyl trong bia, thường được báo cáo là hợp chất có đặc tính nhận cảm trung hòa. Thuật ngữ "môi trường lên men" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường có chứa cơ chất chứa hydrat cacbon mà có thể được lên men bởi nấm men hoặc các vi sinh vật khác để sản xuất, ví dụ, bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê. Ví dụ về môi trường lên men bao gồm: hèm rượu, và nước trái cây (như nước nho, nước táo và nước lê). Ví dụ 9 mô tả chi tiết ví dụ về một hèm rượu thích hợp. Thuật ngữ "môi trường ủ chín" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ môi trường có chứa cơ chất chứa hydrat cacbon đã được lên men bởi nấm men hoặc các vi sinh vật khác để sản xuất, ví dụ, bia hoặc rượu vang hoặc rượu táo hoặc rượu lê hoặc rượu xa-kê. Ví dụ về môi trường ủ chín bao gồm hèm rượu và nước trái cây được lên men một phần (như nước nho, nước táo và nước lê). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường lên men hoặc môi trường ủ chín cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM .

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp phần như được mô tả trong bản mô tả này trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm việc sử dụng hợp phần ALDC được mô tả trong bản mô tả này để phân hủy axetolactat trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc

rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Ngoài ra, sáng chế bao gồm việc sử dụng dẫn xuất ALDC theo sáng chế để phân hủy axetolactat trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế do đó được đặc trưng bởi việc xử lý cơ chất bằng hợp phần có chứa ALDC hoặc dẫn xuất ALDC như được mô tả trong bản mô tả này trong quá trình lên men hoặc quá trình tiếp theo quá trình lên men, ví dụ, quá trình ủ chín.

Do đó, theo một số phương án, axetolactat được tách nhóm carboxyl nhờ enzym thành axetoin, kết quả là tránh được sự tạo thành điaxetyl từ axetolactat khi không mong muốn. Theo một số phương án, các enzym khác được sử dụng kết hợp với ALDC để biến đổi α -axetolactat. Ví dụ về các enzym này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axetolactat reductoisomeraza hoặc isomeraza.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng cùng với nấm men thông thường trong quá trình lên men theo mẻ.

Thay vì sử dụng enzym ở trạng thái tự do, có thể sử dụng enzym ở trạng thái được giữ cố định, enzym được giữ cố định này được bổ sung vào hèm rượu trong quá trình lên men hoặc quá trình tiếp theo quá trình lên men (ví dụ, trong quá trình ủ chín). Enzym được giữ cố định cũng có thể được duy trì trong cột mà qua đó hèm rượu lên men hoặc bia được đi qua. Enzym có thể được giữ cố định riêng rẽ, hoặc nấm men được cùng giữ cố định và axetolactat decarboxylaza có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm mức điaxetyl xuống dưới khoảng 1 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,5 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,1 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,05 ppm hoặc khoảng ít hơn 0,01 ppm, hoặc khoảng ít hơn 0,001 ppm. Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm mức điaxetyl xuống dưới 0,1 ppm.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia

và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm hàm lượng VDK dưới 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc ít hơn 0,01 mg/l hoặc ít hơn 0,001 mg/l. VDK tổng chỉ lượng điaxetyl cộng với 2,3-pentandion. Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm tổng hàm lượng VDK dưới 0,1 mg/l.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm mức điaxetyl xuống dưới khoảng 0,5 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,01 mg/l hoặc khoảng ít hơn 0,001 mg/l. Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm mức điaxetyl xuống dưới 0,1 mg/l.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men hoặc ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê để làm giảm các diketone kế cận khác (như 2,3 pentandion) xuống dưới 0,1 mg/l, hoặc khoảng ít hơn 0,05 mg/l, hoặc ít hơn 0,01 mg/l hoặc ít hơn 0,001 mg/l.

Các quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng không chỉ liên quan đến quá trình ủ bia, mà cũng thích hợp để sản xuất đồ uống có cồn thích hợp bất kỳ trong đó mong muốn làm giảm mức điaxetyl hoặc các diketone kế cận khác (ví dụ rượu vang, rượu xa-kê, rượu táo, rượu lê, v.v.). Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng trong sản xuất rượu vang để thu được các ưu điểm tương tự, cụ thể làm giảm thời gian ủ chín và làm đơn giản hóa quy trình. Được đặc biệt quan tâm theo sáng chế là việc sử dụng enzyme biến đổi axetolactat liên quan đến quy trình gọi là quy trình lên men malo-lactic. Quy trình này bị ảnh hưởng bởi các vi sinh vật như loài *Leuconostoc*, *Lactobacillus* hoặc *Pediococcus* được tiến hành sau quá trình lên men chính của rượu vang để làm tăng độ pH của sản phẩm cũng như độ ổn định sinh học của nó và gia tăng hương vị của rượu vang. Hơn nữa, đặc biệt mong muốn

tiến hành lên men vì quá trình này giúp đóng chai nhanh chóng và nhờ đó cải thiện dòng tiền của các nhà máy sản xuất rượu vang một cách đáng kể. Tuy nhiên, không may là, quy trình này có thể làm tăng các hương vị lạ do điaxetyl, việc tạo thành các hương vị lạ này có thể được làm giảm nhờ sự trợ giúp của enzym biến đổi axetolactat.

Do đó, theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế có khả năng sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng điaxetyl thấp hơn, trong đó thời gian cần thiết để sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng điaxetyl thấp hơn được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế có khả năng sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng điaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình lên men (ví dụ lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê), sao cho thời gian cần thiết cho quá trình lên men được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các quy trình theo sáng chế có khả năng sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng điaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Theo một số phương án, hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong quá trình ủ chín hoặc quá trình điều hòa (ví dụ ủ chín/điều hòa bia), sao cho thời gian cần thiết cho quá trình ủ chín hoặc quá trình điều hòa được làm giảm ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20% hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các

quy trình theo sáng chế có khả năng sản xuất đồ uống có cồn với hàm lượng điaxetyl thấp hơn khi so với quy trình không sử dụng hợp phần ALDC và/hoặc hợp phần dẫn xuất ALDC được mô tả trong bản mô tả này, trong đó bước ủ chín được loại bỏ hoàn toàn.

Ngoài ra, theo một số phương án, các quy trình mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình sản xuất etanol trên quy mô công nghiệp vì sản phẩm lên men thu được không có hoặc gần như không có hàm lượng điaxetyl bất kỳ, điều này làm đơn giản hóa quy trình chưng cất, đặc biệt là trong trường hợp chưng cất đồng sôi để điều chế etanol tuyệt đối, tức là etanol khan tinh khiết.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê sao cho ion kim loại có mặt trong môi trường này ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 0,1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 500 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 300 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 100 μM , hoặc từ khoảng 1 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 6 μM đến khoảng 25 μM , hoặc từ khoảng 10 μM đến khoảng 150 mM, hoặc từ khoảng 20 μM đến khoảng 120 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM , hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 250 μM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm vào môi trường (như

môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê trong đó kẽm có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,25 mM đến khoảng 200 mM, như từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và kẽm vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC cao hơn 1 như 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1. Theo một số phương án, enzym ALDC và kẽm được bổ sung trong quá trình lên men và/hoặc quá trình ủ chín. Theo một số phương án, enzym ALDC được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 g đến khoảng 10 g, hoặc từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g, hoặc từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolít của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê" có thể thay thế lẫn nhau với thuật ngữ môi trường. Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 100 μ M đến khoảng 200 mM, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolít của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu

lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM hoặc khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 200 mM, hoặc từ khoảng 100 μM đến khoảng 200 mM, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 2 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, ion kim loại có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 mM đến khoảng 20 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 10 mM, hoặc từ khoảng 1 mM đến khoảng 5 mM. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị

cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và ion kim loại trong hợp phần vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC cao hơn 1, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolít của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và ion kim loại trong hợp phần vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC cao hơn 1, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 g đến khoảng 10 g cho mỗi hectolít của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và ion kim loại trong hợp phần vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC cao hơn 1, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 5 g cho mỗi hectolít của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê bao gồm bổ sung enzym ALDC và ion kim loại trong hợp phần vào môi trường (như môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) cho bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê, trong đó tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC cao hơn 1, và hợp phần có chứa enzym ALDC và ion kim loại được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 g đến khoảng 2 g cho mỗi hectolít

của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê. Theo một số phương án, tỷ lệ mol của ion kim loại so với enzym ALDC bằng 2:1, hoặc 3:1, hoặc 5:1, hoặc 10:1, hoặc 20:1 hoặc 30:1, hoặc 50:1, hoặc 60:1, hoặc cao hơn. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

Sản xuất enzym ALDC

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến axit nucleic có khả năng mã hóa enzym ALDC như được mô tả trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến vật truyền biểu hiện hoặc plasmit có chứa axit nucleic này, hoặc có khả năng biểu hiện enzym ALDC như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh, vật truyền biểu hiện hoặc plasmit có chứa trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ *Trichoderma* như trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ cbhI *T. reesei*. Theo khía cạnh khác, vật truyền biểu hiện hoặc plasmit có chứa trình tự kết thúc có nguồn gốc từ *Trichoderma* như trình tự kết thúc có nguồn gốc từ cbhI *T. reesei*. Theo khía cạnh khác nữa, vật truyền biểu hiện hoặc plasmit có chứa một hoặc nhiều thành phần đánh dấu chọn lọc như amdS và pyrG *Aspergillus nidulans*. Theo khía cạnh khác, vật truyền biểu hiện hoặc plasmit có chứa một hoặc nhiều vùng cuối cho phép duy trì plasmit không phải nhiễm sắc thể trong tế bào chủ.

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến tế bào chủ có sự biểu hiện khác loại của enzym ALDC như được mô tả trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác, tế bào chủ là tế bào nấm. Theo khía cạnh khác nữa, tế bào nấm thuộc chi *Trichoderma*. Theo khía cạnh khác nữa, tế bào nấm thuộc loài *Trichoderma reesei* hoặc thuộc loài *Hypocrea jecorina*. Theo khía cạnh khác, tế bào chủ có chứa, tốt hơn là được biến nạp với, plasmit hoặc vật truyền biểu hiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ vi khuẩn như *Bacillus*. Theo một số phương án enzym ALDC được sản xuất bằng cách nuôi cấy chủng *Bacillus*

subtilis chứa gen mã hóa và biểu hiện enzym ALDC (ví dụ ALDC của *Bacillus brevis*). Ví dụ về tế bào chủ như vậy và việc nuôi cấy chúng được mô tả trong DK149335B.

Ví dụ về vật truyền biểu hiện và/hoặc vật truyền tích hợp thích hợp được đưa ra trong Sambrook et al. (1989) *trên đây*, và Ausubel (1987) *trên đây*, và van den Hondel et al. (1991) trong Bennett and Lasure (Eds.) *More Gene Manipulations In Fungi*, Academic Press pp. 396-428 và patent Mỹ số 5,874,276. Tham khảo thêm danh sách vật truyền trong tài liệu Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, <http://www.fgsc.net>). Các vật truyền đặc biệt hữu dụng bao gồm các vật truyền thu được từ Invitrogen và Promega chẳng hạn. Plasmid thích hợp để sử dụng trong tế bào vi khuẩn bao gồm pBR322 và pUC19 cho phép sao chép trong *E. coli* và pE194 chẳng hạn, cho phép sao chép trong *Bacillus*. Các vật truyền đặc trưng khác thích hợp để sử dụng trong tế bào chủ *E. coli* bao gồm vật truyền như pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDONRTM201, 10 pDONRTM221, pENTRTM, pGEM[®]3Z và pGEM[®]4Z.

Vật truyền đặc trưng thích hợp để sử dụng trong tế bào nấm bao gồm pRAX, một vật truyền biểu hiện mục đích chung hữu dụng trong *Aspergillus*, pRAX với trình tự khởi đầu *glaA*, và trong *Hypocrea/Trichoderma* bao gồm pTrex3g với trình tự khởi đầu *cbh1*.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào nấm và tùy ý là tế bào chủ nấm sợi. Thuật ngữ "nấm sợi" chỉ tất cả các dạng sợi của cấp phân loại phụ Eumycotina (xem, Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, New York). Các nấm này được đặc trưng bởi thể sợi nấm sinh dưỡng với thành tế bào gồm chitin, xenluloza, và các polysacarit phức hợp khác. Nấm sợi theo sáng chế là khác biệt về mặt hình thái, sinh lý, và di truyền với nấm men. Sự phát triển sinh dưỡng bởi nấm sợi là bởi sự kéo dài sợi nấm và sự dị hóa cacbon là ưa khí bắt buộc. Theo sáng chế, tế bào nấm sợi cha mẹ có thể là tế bào thuộc loài, nhưng không giới hạn ở, *Trichoderma* (ví dụ, *Trichoderma reesei*, kiểu hình thái vô tính của *Hypocrea jecorina*, trước đây được phân loại là *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53 (1984); ATCC số 56765 và ATCC số 26921), *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (ví dụ, *H. insolens*, *H. lanuginosa* và *H. grisea*), *Chrysosporium* sp. (ví dụ, *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (ví dụ, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A.*

nidulans, và *A. awamori*) (Ward et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743 (1993) và Goedegebuur et al., *Curr. Genet.* 41:89 -98 (2002)), *Fusarium sp.*, (ví dụ, *F. roseum*, *F. gramineum*, *F. cerealis*, *F. oxysporum*, và *F. venenatum*), *Neurospora sp.*, (*N. crassa*), *Hypocrea sp.*, *Mucor sp.* (*M. miehei*), *Rhizopus sp.*, và *Emericella sp.* (xem thêm , Innis et al., *Science* 228:21 -26 (1985)). Thuật ngữ "*Trichoderma*" hoặc "*Trichoderma sp.*" hoặc "*Trichoderma spp.*" dùng để chỉ chi nấm bất kỳ đã được phân loại hoặc hiện đang được phân loại là *Trichoderma*.

Theo một số phương án, tế bào chủ sẽ là tế bào vi khuẩn gram dương. Ví dụ không giới hạn bao gồm chủng *Streptomyces* (e.g., *S. lividans*, *S. coelicolor*, và *S. griseus*) và *Bacillus*. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "giống *Bacillus*" bao gồm tất cả các loài trong giống "*Bacillus*," như đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, và *B. thuringiensis*. Đã nhận thấy rằng giống *Bacillus* tiếp tục trải qua sự tái cấu trúc phân loại. Do đó, dự định rằng giống này bao gồm các loài đã được tái phân loại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các sinh vật như *B. stearothermophilus*, mà hiện nay được đặt tên là "*Geobacillus stearothermophilus*."

Theo một số phương án, tế bào chủ là chủng vi khuẩn gram âm, như *E. coli* hoặc *Pseudomonas sp.* Theo các phương án khác, tế bào chủ có thể là tế bào nấm men như *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, hoặc *Candida sp.* Theo các phương án khác, tế bào chủ sẽ là tế bào chủ được thiết kế di truyền trong đó các gen nguyên thể đã được làm bất hoạt, ví dụ bằng cách làm khuyết trong tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm. Khi mong muốn thu được tế bào chủ dạng nấm có một hoặc nhiều gen đã được làm bất hoạt, có thể sử dụng các phương pháp đã biết (ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,246,853, patent Mỹ số 5,475,101, và WO 92/06209). Sự bất hoạt gen có thể được thực hiện bằng cách làm khuyết một phần hoặc hoàn toàn, bằng bất hoạt cài xen hoặc bằng biện pháp bất kỳ khác làm cho gen không có chức năng cho mục đích dự định của nó (sao cho gen được ngăn không biểu hiện protein chức năng). Theo một số phương án, khi tế bào chủ là tế bào *Trichoderma* và cụ thể là tế bào chủ *T. reesei*, các gen *cbh1*, *cbh2*, *egl1* và *egl2* sẽ được hoạt hóa và/hoặc bị làm khuyết. Tế bào chủ *Trichoderma reesei* nêu làm ví dụ có bốn protein bị

làm khuyết được nêu và mô tả trong patent Mỹ số 5,847,276 và WO 05/001036. Theo các phương án khác, tế bào chủ là chủng thiếu hụt proteaza hoặc không có proteaza. Thuật ngữ chủng "thiếu hụt proteaza" hoặc "chủng không có proteaza" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào chủ thu được hoặc có khả năng thu được từ tế bào cha mẹ trong đó tế bào chủ này có chứa một hoặc nhiều biến đổi di truyền làm cho tế bào chủ sản xuất một hoặc nhiều proteaza (ví dụ proteaza chức năng) với lượng giảm khi so với tế bào cha mẹ; tốt hơn là tế bào chủ này thiếu hụt một hoặc nhiều proteaza được chọn từ nhóm bao gồm WprA, Vpr, Epr, IspA, Bpr, NprE, AprE, ampS, aprX, bpf, clpCP, clpEP, clpXP, codWX, lonA, lonB, nprB, map, mlpA, mpr, pepT, pepF, dppA, yqyE, tepA, yfiT, yfiG, ymfF, ypwA, yrrN, yrrO, và ywaD. Tế bào chủ biến thể có nguồn gốc từ tế bào cha mẹ được tạo ra, tế bào chủ biến thể này có chứa một hoặc nhiều biến đổi di truyền làm cho tế bào của chủng biến thể sản xuất một hoặc nhiều proteaza với lượng giảm khi so với tế bào cha mẹ.

Việc đưa vật truyền hoặc cấu trúc ADN vào tế bào chủ bao gồm các kỹ thuật như biến nạp; đục lỗ điện; vi tiêm nhân; tải nạp; chuyển nhiễm, (ví dụ, chuyển nhiễm qua trung gian liposom và chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-Dextrin); ủ với chất kết tủa ADN canxi phosphat; bắn vi đạn phủ ADN với tốc độ cao; và dung hợp tế bào trần. Các kỹ thuật biến nạp chung là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Ausubel et al. (1987) *trên đây*, chương 9; và Sambrook et al. (1989) *trên đây*, và Campbell et al., *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989)).

Phương pháp biến nạp đối với *Bacillus* được bộc lộ trong nhiều tài liệu tham khảo khác nhau bao gồm Anagnostopoulos C. and J. Spizizen, *J. Bacteriol.* 81:741-746 (1961) và WO 02/14490.

Phương pháp biến nạp đối với *Aspergillus* được mô tả trong Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474 (1984); Berka et al., (1991) trong *Applications of Enzyme Biotechnology*, Eds. Kelly and Baldwin, Plenum Press (NY); Cao et al., *Protein Sci.* 9:991-1001 (2000); Campbell et al., *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989), và EP 238 023. Sự biểu hiện của protein khác loại trong *Trichoderma* được mô tả trong patent Mỹ số 6,022,725; patent Mỹ số 6,268,328; Harkki et al. *Enzyme Microb. Technol.* 13:227-233 (1991); Harkki et al., *BioTechnol.* 7:596-603 (1989); EP 244,234; EP 215,594; và Nevalainen et al., "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", trong

Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) pp. 129-148). Ngoài ra, tham khảo thêm W096/00787 và Bajar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8202-8212 (1991) về việc biến nạp chủng *Fusarium*.

Theo một khía cạnh, phần mô tả đề cập đến phương pháp phân lập enzym ALDC như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm bước cảm ứng sự tổng hợp enzym ALDC trong tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này có sự biểu hiện khác loại của enzym ALDC này và thu hồi protein ngoại bào được tiết bởi tế bào chủ này, và tùy ý tinh chế enzym ALDC. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến phương pháp sản xuất enzym ALDC như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm bước cảm ứng sự tổng hợp enzym ALDC trong tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này có sự biểu hiện khác loại của enzym ALDC này, và tùy ý tinh chế enzym ALDC. Theo khía cạnh khác, phần mô tả đề cập đến phương pháp biểu hiện enzym ALDC như được xác định trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm thu tế bào chủ như được xác định trong bản mô tả này, hoặc tế bào chủ thích hợp bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và biểu hiện enzym ALDC từ tế bào chủ này, và tùy ý tinh chế enzym ALDC. Theo khía cạnh khác, enzym ALDC như được xác định trong bản mô tả này là protein tiết chiếm ưu thế.

Theo một số phương án, ion kim loại như Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng được bổ sung vào môi trường (như môi trường nuôi cấy và/hoặc môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín) trong quá trình sản xuất và/hoặc sau quá trình sản xuất ALDC để làm tăng hiệu suất được thu hồi từ vi sinh vật.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μM đến khoảng 1 mM. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 μM đến khoảng 50 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 30 μM đến khoảng 40 μM . Theo một số phương

án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 40 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ sản xuất ALDC có chứa ion kim loại ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 60 μM đến khoảng 150 μM . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Cu^{2+} , và Fe^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm Zn^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} hoặc Mn^{2+} . Theo một số phương án, ion kim loại là Zn^{2+} . Theo một số phương án, hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 950 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein hoặc từ 1500 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein. Thuật ngữ "tế bào chủ sản xuất ALDC" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào chủ có khả năng biểu hiện enzym ALDC khi tế bào chủ này được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của trình tự axit nucleic mã hóa ALDC. Trình tự axit nucleic mã hóa enzym ALDC có thể khác loại hoặc tương đồng với tế bào chủ. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất ALDC là *Bacillus subtilis*. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa gen mã hóa và biểu hiện enzym ALDC trong đó enzym ALDC có chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa trình tự axit nucleic mã hóa ALDC trong đó trình tự axit nucleic mã hóa ALDC này có độ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của nó. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất ALDC là *Bacillus subtilis* có chứa gen mã hóa ALDC có nguồn gốc từ *Bacillus brevis*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ sau, các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn theo cách bất kỳ phạm vi của sáng chế như được yêu cầu bảo hộ. Các hình vẽ đính kèm được dự định xem là các phần không thể thiếu để xác định đặc

điểm và mô tả sáng chế. Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa, mà không nhằm mục đích giới hạn sáng chế như được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1 - Sự biểu hiện khác loại của axetolactat decarboxylaza, aldB

Gen aldB *Brevibacillus brevis* (có thể được đề cập đến là *Bacillus brevis*) axetolactat decarboxylaza (ALDC) đã được xác định từ trước (Diderichsen et al., *J Bacteriol.* (1990) 172(8): 4315), với trình tự được nêu với Mã số Truy cập UNIPROT là P23616.1. Trình tự của gen này, *aldB*, được minh họa trong SEQ ID NO:1. Các nucleotit được in đậm và gạch chân là các nucleotit mã hóa peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 1 nêu trình tự nucleotit của gen aldB:

atgaaaaaaaaatatcatcacttctatcacatctctggctctcggttgcgggctgtctttgactgcttttgacgct
acaacggctactgtaccagcaccacctgccaagcaggaatccaaacctgcggtgccgctaataccggcaccaaaaaatgta
ctgtttcaataactcaacgatcaatgcactcatgcttgacagttgaaggggacttgactttgaaagacctgaagctgcgaggc
gatatggggcttggtaccatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcgacagcaccg
gaaaattatcgagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaactacatta
accaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaattgaaaacaagaacgtcttttatgccgtaaagctg
accggtaccttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactgaagtaacaaaa
aacaatccgagtttgaatttaaaaatgtaagggaaccctgattggcttctatagccaaattatgcagcagccctgaatgttcc
cggattccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtgccggacacgtattaaatctgcaatttgacaacgcgaatctgg
aaatttctccgatccatgagtttgatgtacaattgccgcacacagatgatttggccactctgatctgacacaagttactactagc
caagtacaccaagctgagtcagaaagaaaataa

SEQ ID NO: 6 đưa ra ví dụ về trình tự nucleotit mã hóa axetolactat decarboxylaza - các nucleotit được in đậm và gạch chân là các nucleotit mã hóa peptit tín hiệu:

atgaaaaaaaaatatcatcacttctatcacatctctggctctcggttgcgggctgtctttgactgcttttgacgct
acaacggctactgtaccagcaccacctgccaagcaggaatccaaacctgtggttgcgctaataccggcaccaaaaa
atgtactgtttcaataactcaacgatcaatgcactcatgcttgacagttgaaggggacttgactttgaaagacctgaa
gctacgaggcgatattgggcttggtaccatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagat
cgacagcaccggaaaattatccgagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaa
aaaactacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaattgaaaacaagaacgtcttttatg
ccgtaaagctgaccggtaccttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactga
agtaacaaaaaaacaatccgagtttgaatttaaaaatgtaagggaaccctgattggcttctatagccaaattatgcagcagc
cctgaatgttcccgattccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtgccggacacgtattaaatctgcaatttgacaa

cgcgaaatctggaaatttctccgatccatgagtttgatgtacaattgccgcacacagatgattttgccactctgatctgacacaa
gttactactagccaagtacaccaagctgagtcagaaagaaaataa

Proenzym mã hóa bởi gen *aldB* được mô tả trong SEQ ID NO: 2. Ở đầu tận cùng N, protein này có peptit tín hiệu có chiều dài 24 axit amin như được dự đoán bởi SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, *Nature Protocols* (2007) 2: 953-971). Trình tự peptit tín hiệu này được gạch chân và in đậm trong SEQ ID NO:2. Sự có mặt của peptit tín hiệu chỉ ra rằng axetolactat decarboxylaza, *aldB* này là enzym được tiết. Trình tự của chuỗi trưởng thành, đã được xử lý đầy đủ, theo dự đoán (*aldB*, 261 axit amin) được mô tả trong SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 2 nêu trình tự axit amin của tiền chất aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC):

MKKNITSITSLALVAGLSLTAFAATTATVPAPPAKQESKPAVAANPA
PKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTK
FYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFEN
KNVIFYAVKLTGTFKMVKARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTIG
FYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPH
TDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 7 nêu ví dụ về trình tự axit amin của tiền chất aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC) - trình tự peptit tín hiệu được gạch chân và viết đậm:

MKKNITSITSLALVAGLSLTAFAATTATVPAPPAKQESKPVVAANPA
PKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTK
FYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFEN
KNVIFYAVKLTGTFKMVKARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTIG
FYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPH
TDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 3 nêu trình tự axit amin được dự đoán của aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC) trưởng thành (261 axit amin):

ATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLT
LKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTT
HFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMVKARTVP
KQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITED

KTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTTSQVHQAES
ERK

SEQ ID NO: đưa ra ví dụ về trình tự axit amin dự đoán của aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC) trưởng thành (261 axit amin):

ATTATVPAPPAKQESKPVVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLT
LKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSELPESVKTPFAVTT
HFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMVKARTVP
KQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITED
KTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTTSQVHQAES
ERK

Gen *aldB* từ chủng *Brevibacillus brevis* mã hóa enzym axetolactat decarboxylaza (ALDC) được sản xuất trong *B. subtilis* sử dụng catxet biểu hiện tích hợp gồm trình tự khởi đầu *B. subtilis aprE*, trình tự peptit tín hiệu *B. subtilis aprE*, *aldB* trưởng thành và trình tự kết thúc BPN'. Catxet này được tách dòng theo hướng đầu này đến đầu kia đối với catxet biểu hiện và catxet biểu hiện *aldB* được đưa vào *B. subtilis* bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Bản đồ của vật truyền chứa gen *aldB* (RIHI-*aldB*) được thể hiện trên Hình 1.

Trình tự nucleotit trưởng thành của gen *aldB* trong plasmid RIHI-*aldB* được mô tả trong SEQ ID NO:4.

gctacaacggctactgtaccagcaccacctgccagcaggaatccaaacctgcggttgccgctaataccggcacc
aaaaaatgtactgtttcaatactcaacgatcaatgcactcatgcttggacagtttgaaggggacttgactttgaaagacctgaa
gctgcgaggcgatatggggcttggtaccatcaatgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatc
gacagcaccggaaaattatcgagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaa
aaactacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaatttgaaaacaagaacgtctttatgc
cgtaaagctgaccggtacttttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctgactgaa
gtaacacaaaaacaatccgagtttgaatttaaaaatgtaagggaaccctgattggcttctatacgccaaattatgcagcagcc
ctgaatgttcccgattccatctccacttcacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaaatctgcaatttgacaac
gcgaatctggaaatttctccgatccatgagtttgatgttcaattgccgcacacagatgatttggccactctgatctgacacaagt
tactactagccaagtacaccaagctgagtcagaaagaaaa

Trình tự axit amin của protein tiền *aldB* được biểu hiện từ plasmid RIHI-*aldB* được mô tả trong SEQ ID NO:5.

vrskklwisllfaltliftmafsnmsaqaATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLF
 QYSTINALMLGQFEGDLTKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDS
 TGKLSELPESVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNV FY
 AVKLTGTFKMVKARTV PKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLIGFYTPN
 YAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFA
 HSDLTQVTTSQVHQAESERK</pt3339

Trình tự peptit tín hiệu được thể hiện bằng chữ viết thường, nghiêng, đậm trong SEQ ID NO:5.

Điều kiện nuôi cấy quy mô nhỏ

Để sản xuất aldB, thể biến nạp chủng *B. subtilis* chứa catxet biểu hiện *aldB* được nuôi cấy trong ống Falcon dung tích 15 ml trong 5 giờ trong (canh) TSB với 300 ppm beta-clo-D-alanin (CDA), và 300 µl môi trường tiền nuôi cấy này được bổ sung vào bình dung tích 500 ml được nạp 30 ml môi trường nuôi cấy (được mô tả dưới đây) được bổ sung 300 ppm CDA và 50 µM Zn²⁺. Các bình này được ủ trong 24, 48 và 72 giờ ở nhiệt độ 33°C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút. Các giống cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 14500 vòng/phút trong 20 phút trong ống hình nón. Các dịch nổi bề mặt nuôi cấy được sử dụng để xác định và thử nghiệm protein. Môi trường nuôi cấy là môi trường bán xác định được làm giàu dựa trên chất đệm MOP, với ure là nguồn nitơ chính, maltrin là nguồn cacbon chính.

Điều kiện lên men cấp thức ăn theo mẻ

Để sản xuất aldB, thể biến nạp chủng *B. subtilis* chứa catxet biểu hiện *aldB* được nuôi cấy trong bình dung tích 250 ml chứa 30 ml môi trường phức hợp với 300 ppm beta-clo-D-alanin (CDA). Bình này được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37 °C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút.

Giống cấy được chuyển vào thiết bị lên men có khuấy chứa 7 lít thành phần môi trường vô trùng như được mô tả trong bảng 1 dưới đây. Nhiệt độ được kiểm soát ở 37 °C; pH được kiểm soát ở 7,5 sử dụng amoni hydroxit làm dung dịch chuẩn kiềm; oxy hòa tan được duy trì ở 40 % hoặc cao hơn bằng cách duy trì dòng khí ở tốc độ dòng 7 lít/phút, áp suất dư không đổi bằng 1 bar và điều chỉnh tốc độ khuấy. Khi glucoza ban đầu đã được sử dụng hết profin cấp để cấp dung dịch glucoza nồng độ 60% vào thiết bị lên men được bắt đầu (tốc độ cấp ban đầu là 20 g/giờ tăng tuyến tính đến 32,8 g/giờ trong hơn 7 giờ và được giữ không đổi ở tốc độ đó cho đến khi kết thúc lên men).

Thời gian lên men tổng cộng là 44 giờ.

Bảng 1 Công thức pha chế môi trường để lên men ALDC

Ví dụ xác định <u>Xác</u> <u>tiêu chuẩn</u> không có chất Protein bằng gel đo độ đục sử Gel Doc™ được sử dụng Đệm mẫu (2x) (Bio-	Thành phần	Công thức pha chế Nồng độ (g/kg canh)	2 - Phương pháp protein <u>định protein nhờ</u> <u>của bộ tạo ảnh</u> <u>nhuộm</u> được định lượng SDS-PAGE và máy dùng hệ tạo ảnh EZ. Các thuốc thử trong thử nghiệm: Laemmli cô đặc Rad, Catalô #161-
	Bột đậu tương	50,0	
	Axit xitric	0,10	
	Magie sulfat heptahydrat	2,29	
	Kali Phosphat, Mono Bazơ	5,44	
	Sắt (II) sulfat, heptahydrat	0,029	
	Mangan Sulfat Mono hydrat	0,051	
	Kẽm sulphat heptahydrat	0,001	
	Glucosa mono hydrat	1,10	
	Chất chống bọt	3,00	

0737); XT 26 lỗ 4-12 % Bis-Tris Gel (Bio-Rad, Catalô #345-0125); gen đánh dấu protein "Precision Plus Protein Standards" (Bio-Rad, Catalô #161- 0363); protein BSA chuẩn (Thermo Scientific, Catalô #23208) và SimplyBlue Safestain (Invitrogen, Catalô #LC 6060). Thử nghiệm được tiến hành như sau: Trong đĩa PCR có 96 lỗ, 50µl mẫu enzym đã được pha loãng được trộn với 50 µl đệm mẫu chứa 2,7 mg DTT. Đĩa được bít kín bằng Màng vi bít kín 'B' từ Bio-Rad và được đặt vào thiết bị PCR để được gia nhiệt đến 70 °C trong 10 phút. Sau đó, ngăn được nạp đệm chạy, catxet gel được thiết lập. Sau đó, 10 µl mỗi mẫu và mẫu chuẩn (0,125-1,00 mg/ml BSA) được nạp lên trên gel và 5 µl chất chỉ thị được nạp. Sau đó, tiến hành điện di ở 200 V trong 45 phút. Sau khi điện di, gel được rửa 3 lần 5 phút trong nước, sau đó được nhuộm trong Safestain qua đêm và cuối cùng được khử nhuộm trong nước. Sau đó, gel được chuyển đến Bộ tạo ảnh. Phần mềm Image Lab được sử dụng để tính toán mật độ của mỗi băng. Nhờ biết được lượng protein của mẫu chuẩn, có thể thiết lập được đường cong hiệu chỉnh. Lượng mẫu có thể được xác định bởi mật độ của băng và đường cong hiệu chỉnh. Phương pháp định lượng protein được sử dụng để điều chế các mẫu enzym

aldB axetolactat decarboxylaza được sử dụng cho các thử nghiệm được thể hiện trong các ví dụ tiếp theo.

Ví dụ 3 - Phương pháp thử nghiệm hoạt tính

Thử nghiệm phổ quang kế của α -axetolactat decarboxylaza

α -Axetolactat decarboxylaza (ALDC) xúc tác sự khử nhóm carboxyl của α -axetolactat thành axetoin. Sản phẩm phản ứng axetoin có thể được định lượng theo cách đo màu. Axetoin được trộn với α -naphthol và creatin tạo thành màu đỏ đặc trưng hấp thụ ở OD_{522 nm}. Hoạt tính ALDC được tính toán dựa trên OD_{522 nm} và đường cong hiệu chỉnh axetoin. Thử nghiệm được tiến hành như sau: 20 mM cơ chất axetolactat được điều chế bằng cách trộn 100 μ l etyl-2-axetoxy-2-metylaxetoaxetat (Sigma, Catalô# 220396) với 3,6 ml NaOH 0,5 M ở nhiệt độ 10 °C trong 10 phút. 20 ml MES 50 mM pH 6,0 được bổ sung, pH được điều chỉnh đến pH 6,0 và thể tích được điều chỉnh đến 25 ml bằng 50 mM MES pH 6,0. 80 μ l cơ chất axetolactat 20 mM được trộn với 20 μ l mẫu enzym đã được pha loãng trong 50 mM MES, pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05 % BRIJ 35 và 0,01 % BSA. Hỗn hợp cơ chất/enzym được ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 10 phút. Sau đó, 16 μ l hỗn hợp cơ chất/enzym được chuyển đến 200 μ l 1 M NaOH, 1,0 % α -naphthol (Sigma, Catalô# 33420) và 0,1 % creatin (Sigma, Catalô# C3630). Hỗn hợp cơ chất/enzym/thuốc thử màu được ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 20 phút và sau đó, đọc OD_{522 nm}. Một đơn vị hoạt tính ALDC được định nghĩa là lượng enzym sản xuất 1 μ mol axetoin cho mỗi phút trong các điều kiện của thử nghiệm.

Ví dụ 4 - Ảnh hưởng của kẽm đến hoạt tính của ALDC

Sự có mặt của Zn^{2+} trong quá trình lên men bình lắc

ZnSO₄ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để lên men quy mô nhỏ như được mô tả trong Ví dụ 1 ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0 mM đến 800 μ M. Thử nghiệm nạp aldB. *B. subtilis* chứa catxet biểu hiện *aldB* được nuôi cấy trong ống Falcon dung tích 15 ml trong 5 giờ trong (canh) TSB với 300 ppm beta-clo-D-alanin (CDA), và 300 μ l môi trường tiền nuôi cấy này được bổ sung vào mỗi bình dung tích 500 ml được nạp 30 ml môi trường nuôi cấy đã bổ sung 300 ppm CDA và chứa 0, 5, 25, 50, 100, 200, 400 và 800 μ M Zn^{2+} . Các bình này được ủ trong 24 và 48 giờ ở nhiệt độ 33°C với bước trộn quay không đổi ở tốc độ 180 vòng/phút. Các giống cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 14500 vòng/phút trong 20 phút trong ống hình nón. Các dịch nổi bề mặt nuôi cấy được sử dụng cho các thử nghiệm xác định protein và hoạt tính ALDC

(Bảng 2 và 3) Đã thấy rõ rằng việc tăng nồng độ Zn^{2+} trong môi trường lên men làm tăng hoạt tính ALDC tổng cộng và hoạt tính riêng của enzym aldB đã được biểu hiện.

Bảng 2 Hoạt tính ALDC của các mẫu lên men aldB với hàm lượng thay đổi của Zn^{2+} sau khi lên men 24 và 48 giờ

	Hoạt tính ALDC		
	ZnSO ₄ trong mẫu	24 giờ lên men	48 giờ lên men
	μM	U/ml	U/ml
aldB	0	298,6	235,3
	5	371,9	354,8
	25	533,9	808,0
	50	606,4	965,3
	100	633,4	668,8
	200	617,6	629,5
	400	691,1	488,5
	800	428,1	474,0

Bảng 3 Hoạt tính ALDC, aldB protein và hoạt tính riêng của các mẫu lên men aldB với mức Zn^{2+} thay đổi sau 48 giờ lên men

	ZnSO ₄ trong mẫu	Hoạt tính ALDC	Protein AldB	Hoạt tính riêng
	μM	U/ml	mg/ml	U/mg
aldB	0	235,3	0,626	375,9
	5	354,8	0,736	482,1
	25	808,0	1,437	562,3
	50	965,3	1,573	609,9
	100	668,8	0,957	698,9

Ví dụ 5 - Điều biến hoạt tính riêng của các mẫu aldB

Đáp ứng với liều lượng kẽm của ALDC ở nhiệt độ 50 °C

ZnSO₄ được bổ sung vào mẫu lên men ALDC để tạo ra các nồng độ nằm trong khoảng từ 0 mM đến 20 mM. Các mẫu được giữ ở nhiệt độ 50 °C trong 60 phút và sau đó, hoạt tính được xác định như được mô tả trong Ví dụ 3. So với mẫu không được bổ sung kẽm, các mẫu với >0,5 mM kẽm có hoạt tính cao hơn >200%. Hình 2 thể hiện các kết quả.

Ví dụ 6 - Điều biến hoạt tính đặc hiệu của men aldB

Hoạt tính AldB được tạo ra như được mô tả trong (Ví dụ 1) và hoạt tính được xác định như được mô tả trong (Ví dụ 3). Mẫu men AldB được pha loãng trong 50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05% Brij, 0,01% BSA (albumin huyết thanh bò) đến khoảng 1000 U/ml và sau đó được ủ với các nồng độ khác nhau của ZnSO₄ trong các bước sau: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 7.5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mM. Tất cả các mẫu đều được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 68 giờ, sau đó được ly tâm và dịch nổi bề mặt được phân tích về hoạt tính và protein bởi phân tích SDS-PAGE chuẩn. Kết quả của phân tích SDS-PAGE được thể hiện trên Hình 3 và hoạt tính, nồng độ protein và hoạt tính riêng xác định được đưa ra trong bảng 4. Có thể thấy rằng hoạt tính ALDC tăng theo nồng độ tăng dần của ZnSO₄ trong mẫu cho đến tận khoảng 5-10 mM từ đó hoạt tính này ổn định nhiều hoặc ít hơn với nồng độ cao hơn của ZnSO₄. Nồng độ của protein aldB trong mẫu được xác định là ổn định ít hoặc nhiều hơn trong tất cả các mẫu, cho thấy sự tăng rõ rệt hoạt tính riêng từ 968 U/mg trong mẫu không có ZnSO₄ lên đến 2200-2400 U/mg trong mẫu có 5mM ZnSO₄ hoặc nhiều hơn sau khi ủ.

Bảng 4 Hoạt tính ALDC, nồng độ protein aldB và hoạt tính riêng của mẫu aldB được ủ với ZnSO₄ ở nhiệt độ 4 °C trong 68 giờ .

	ZnSO₄ trong mẫu	Hoạt tính ALDC	Protein AldB	Hoạt tính riêng
	mM	U/ml	mg/ml	U/mg
aldB	0	556	0,57	968
	0,25	875	0,63	1387
	0,5	949	0,63	1512

	1	1058	0,59	1792
	2	1271	0,60	2124
	5	1411	0,60	2354
	7,5	1485	0,64	2311
	10	1520	0,64	2368
	20	1492	0,64	2344
	40	1499	0,67	2239
	60	1495	0,64	2345
	80	1500	0,65	2324
	100	1607	0,64	2520
	120	1520	0,69	2209

Ví dụ 7 - Tinh chế aldB

Việc sản xuất aldB trong *B. subtilis* được tiến hành như được mô tả trong ví dụ (1). Môi trường lên men được làm sạch bằng cách ly tâm (4000 vòng/phút trong 15 phút) và lọc (VacuCap 90, 0,2 μ m). Mẫu được loại muối trên cột PD10, được điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được làm cân bằng với 20 mM Tris/HCl, pH 8,0. Nước giải hấp được giữ trên nước đá, sau đó, trước khi được tinh chế thêm bởi sắc ký trao đổi anion trên Source 15Q XK26/15. Cột được trang bị trên hệ thăm dò ÄKTA được sử dụng để tinh chế protein và theo phương pháp được mô tả bởi nhà sản xuất (GE healthcare, USA – Cat. No. 18-1112-41).

Cột được điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được làm cân bằng với 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (chất đệm A). Mẫu được loại muối được cấp vào cột với tốc độ dòng bằng 5 ml/phút và cột được rửa bằng chất đệm A. Protein đã được liên kết được rửa giải với gradien tuyến tính bằng 0-0,30 M NaCl trong 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (7 ml/phút, 40 phút). Trong toàn bộ chu trình, các phân đoạn khoảng 10-20 ml được thu gom.

Các phân đoạn từ quá trình tinh chế được phân tích bởi SDS-PAGE sử dụng pin tiêu Xcell và theo phương pháp được mô tả bởi nhà sản xuất (Invitrogen, USA – Cat. No. EI0001) sử dụng: Nu-PAGE gel (Invitrogen, USA – Cat. No. NP0321), chất đệm

chạy MES (Invitrogen, USA – Cat. No. NP0002), chất chỉ thị chuẩn See Blue (Invitrogen, USA – Cat. No. LC5925) và được nhuộm màu bằng Coomassie Brilliant-Blue.

AldB được quan sát thấy là liên kết ở cột Source 15Q và được rửa giải với khoảng 30 mM NaCl. Các phân đoạn AldB được thu gom, được cô (trên 10 kDa UF Vivaspin) và được loại muối trong chất đệm 25 mM HEPES chứa 150 mM NaCl, pH 8,0. Độ tinh khiết theo ước tính của aldB là lớn hơn 95% và kết quả phân tích SDS-page của aldB đã tinh chế được thể hiện trên hình 4.

Ví dụ 8 - Điều biến hoạt tính riêng của aldB đã được tinh chế

Protein aldB đã được tinh chế được tách ion hóa trị hai bằng cách ủ aldB (khoảng 2 mg/ml) với 20mM EDTA trong 0,2x chất đệm thử nghiệm (50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05% Brij, 0,01% BSA) ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Nguyên liệu đã được xử lý bằng EDTA được loại muối trên cột PD10 đã được điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được làm cân bằng với 50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05 % Brij, 0,01 % BSA. Hoạt tính ALDC và nồng độ của protein AldB trong mẫu trước và sau khi xử lý bằng EDTA và cột loại muối được xác định như được mô tả trong ví dụ (2 và 3) và kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5 Hoạt tính ALDC, nồng độ protein aldB và hoạt tính riêng của aldB đã được tinh chế trước và sau quy trình EDTA-loại muối.

	Hoạt tính ALDC	Nồng độ protein AldB	Hoạt tính riêng
	U/ml	mg/ml	U/mg
AldB được tinh chế	5187	5,6	928
AldB được tinh chế - Được xử lý bằng EDTA và loại muối	9	1,0	9

50 µl mẫu aldB đã được xử lý bằng EDTA và loại muối được trộn với 450 µl 0,2x chất đệm thử nghiệm (50 mM MES pH 6,0, 0,6 M NaCl, 0,05 % Brij, 0,01 % BSA) với ZnSO₄ thay đổi trong bước này: lần lượt là 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 và 20mM. Các mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các mẫu được ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút và hoạt tính ALDC và nồng độ của protein AldB được

xác định trong dịch nổi bề mặt. Kết quả được thể hiện trong bảng 6. Có thể thấy rằng hoạt tính ALDC tăng khi nồng độ của ZnSO_4 tăng trong quá trình ủ. Nồng độ của protein AldB trong mẫu được xác định là không đổi trong tất cả các mẫu, cho thấy sự tăng hoạt tính riêng từ 2 U/mg aldB trong mẫu không có ZnSO_4 lên đến 1800 U/mg aldB trong các mẫu có 5mM ZnSO_4 hoặc nhiều hơn sau khi ủ.

Bảng 6 Hoạt tính ALDC, nồng độ protein AldB và hoạt tính riêng của aldB đã được tinh chế trước và sau khi ủ với ZnSO_4 .

Nồng độ của ZnSO_4 trong 0,2X chất đệm thử nghiệm	Nồng độ cuối cùng của ZnSO_4	Hoạt tính ALDC	Nồng độ protein AldB	Hoạt tính riêng
mM	mM	U/ml	mg/ml	U/mg
0	0	0,1	0,092	2
0,05	0,045	4,4	0,092	48
0,1	0,09	26,1	0,092	283
0,5	0,45	147,1	0,092	1599
1	0,9	157,7	0,092	1714
2	1,8	157,9	0,092	1716
5	4,5	166,4	0,092	1809
10	9	174,6	0,092	1898
20	18	173,5	0,092	1886

Ngoài ra, 20 μl mẫu aldB đã được xử lý bằng EDTA và loại muối được trộn với 180 μl 50 mM MES pH 6,0 lần lượt được bổ sung 10 mM ZnSO_4 , MnSO_4 hoặc CoCl_2 . Các mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C và được thử nghiệm sau 45 phút, 1 ngày, 2 ngày và 3 ngày. Kết quả được thể hiện trong bảng 7. Hoạt tính tăng đối với việc ủ với cả ba ion hóa trị hai theo thứ tự Zn^{2+} , Mn^{2+} và Co^{2+} so với đối chứng (bổ sung H_2O). Sau 45 phút, hoạt tính được thấy là giảm theo thời gian. Việc bổ sung Zn^{2+} , Mn^{2+} và Co^{2+} tất cả đều tạo ra độ ổn định (hoạt tính) tăng sau 3 ngày so với đối chứng bổ sung H_2O . Hoạt tính còn lại được xác định sau 3 ngày so với thời điểm ban đầu là 76,9 %, 73,5 % và 70,7 % khi bổ sung Zn^{2+} , Mn^{2+} và Co^{2+} so với 56,0 % thu được khi bổ sung H_2O , như được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7 Hoạt tính ALDC sau khi ủ ở độ pH 6,0 với $MnSO_4$, $CoCl_2$ hoặc $ZnSO_4$ tại các thời điểm khác nhau.

	Hoạt tính U/ml			
	H ₂ O	Mn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺
45 phút	21,8	217,3	101,8	319,7
1 ngày	18,9	219,6	90,5	288,5
2 ngày	22,5	216,2	95,2	295,4
3 ngày	12,2	153,6	74,8	245,7

Ví dụ 9 - Sự khử điaxetyl và 2,3-pentandion trong quá trình lên men bia bằng cách sử dụng aldB với hoạt tính ALDC đặc hiệu khác

Mục đích của phân tích này là để thử nghiệm khả năng làm giảm điaxetyl và 2,3-pentandion (Điketon kế cận, VDK) trong 7 ngày lên men ở nhiệt độ 14 °C của các biến thể hợp phần aldB khác nhau (axetolactat decarboxylaza).

Phân tích ủ mạch nha tinh khiết

1100 g chất chiết mạch nha nhẹ của Munton Light Malt Extract (Mê XB 35189, hạn sử dụng 24.05.2014) được hòa tan trong 3000 ml nước máy ấm (45°C). Huyền phù đặc này được khuấy trong khoảng 10 phút cho đến khi chất lỏng đồng nhất và độ pH được điều chỉnh đến 5,2 bằng 2,5 M axit sulphuric. Bổ sung 10 viên hoa bia đắng từ Hopfenveredlung, St. Johann: hàm lượng alpha bằng 16,0 % (phân tích HPLC đặc trưng EBC 7.7 0, 01.10.2013) vào huyền phù đặc này, sau đó chia vào chai nắp xanh dung tích 500ml và đun sôi trong 1 giờ để đảm bảo sự kết tủa protein và tránh được khả năng nhiễm khuẩn. Chất chiết mạch nha đã lọc (hèm rượu) được lấy mẫu để xác định trọng lượng riêng và Nitơ amino tự do (FAN). Hèm rượu cuối cùng có trọng lượng riêng ban đầu bằng 1048 (tức là 12 °Plato). 200 g hèm rượu đã lọc được bổ sung vào bình hình nón dung tích 500 ml (Bình lên men; FV), và sau đó được làm lạnh xuống 13°C. Mỗi bình hình nón được định liều với 0,5 % W34/70 (Weiherstephan) nấm men mới được sản xuất (1,0 g nấm men cho mỗi 200 g hèm rượu). Các enzym được định liều dựa trên hoạt tính ALDC tương tự (0,03 U/ml hèm rượu, 8 đơn vị ALDC cho mỗi 200 g hèm rượu). Bình lên men đối chứng không có enzym nhận được lượng nước khử ion tương ứng với lượng mẫu enzym.

Các mẫu hèm rượu được lên men trong bình hình nón dung tích 500 ml trong các điều kiện thử nghiệm phòng thí nghiệm đã được chuẩn hóa ở nhiệt độ 14 °C có khuấy nhẹ ở tốc độ 150 vòng/phút trong thiết bị ủ orbitan. Khi tổn hao khối lượng ít hơn 0,25 g trong 24 giờ, nhiệt độ lên men được làm giảm xuống 7 °C. Kết thúc lên men sau tổng cộng 7 ngày. 10 ml mẫu được lấy ra để phân tích điaxetyl và 2,3-pentandion hai lần một ngày, tốt hơn là các nhau từ 11 đến 14 giờ giữa các lần; tại thời điểm cuối của quá trình lên men chỉ lấy 1 mẫu một ngày. Nấm men được để lắng trước khi lấy ra và mỗi mẫu được làm lạnh ở nhiệt độ 10 °C trong 10 phút và sau đó được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 8 °C để lắng cặn nấm men dư bất kỳ. Dịch nổi bề mặt được tách khỏi phần lắng cặn nấm men và các mẫu cho phân tích GC được bổ sung 0,5 g NaCl cho mỗi ml mẫu. Huyền phù đặc được chuyển đến lọ có bộ phận hóa hơi và được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 65 °C trong 30 phút trước khi tiến hành phân tích điaxetyl và 2,3-pentandion bằng sắc ký khí với sự dò khối phổ (GCMS).

Các phân tích được tiến hành tại Agilent 6890N/5973N GC với thiết bị tự lấy mẫu tự động có bộ phận hóa hơi CombiPAL và phần mềm thu nhận và phân tích MSChemStation. Các mẫu được làm cân bằng ở nhiệt độ 70 °C trong 10 phút trước khi bơm 500 µl pha khí ở trên mẫu lên trên cột J&W 122-0763 DB-1701 (60 m x 0,25 mmID x 1 µm). Nhiệt độ bơm là 260°C và hệ được vận hành ở tốc độ dòng heli không đổi bằng 2 ml/phút. Nhiệt độ lò là: 50°C (2 phút), 160°C (20°C/phút), 220°C (40°C/phút), giữ trong 2 phút. Phép dò MS được thực hiện với 500 µl với tỷ lệ chia tách 5:1 ở các ion đã được chọn. Tất cả các mẫu đều được chạy trong hai bản sao và các mẫu chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng nước máy có bổ sung điaxetyl hoặc 2,3-pentandion.

Nồng độ của hợp chất được tính toán dưới dạng

$$\text{Hợp chất (mg/l)} = \text{RF} \times \frac{\text{Diện tích}}{1000 \times W_s}$$

trong đó,

RF là hệ số đáp ứng của axit axetic

Diện tích là diện tích GC của axit axetic

W_s là lượng mẫu được sử dụng (tính bằng ml)

Giới hạn định lượng điaxetyl được xác định là 0,016 mg/l và giới hạn định lượng 2,3-pentandion được xác định là 0,012 mg/l.

Để kiểm tra rằng việc bổ sung enzyme ALDC không ảnh hưởng đến Mức độ lên men thực (RDF) và rượu được sản xuất ra theo thể tích: RDF được xác định bằng cách sử dụng Anton Paar (DMA 5000) tuân theo quá trình ủ theo hướng dẫn chuẩn, 23.8580-B28 và rượu theo quá trình ủ theo hướng dẫn chuẩn, 23.8580-B28.

Giá trị mức độ lên men thực (RDF) có thể được tính toán theo phương trình dưới đây:

$$RDF(\%) = \left(1 - \frac{RE}{^{\circ}P_{\text{ban đầu}}} \right) \times 100$$

Trong đó: RE = chất chiết thực = $(0,1808 \times ^{\circ}P_{\text{ban đầu}}) + (0,8192 \times ^{\circ}P_{\text{cuối cùng}})$, $^{\circ}P_{\text{ban đầu}}$ là trọng lượng riêng của các hèm rượu tiêu chuẩn trước khi lên men và $^{\circ}P_{\text{cuối cùng}}$ là trọng lượng riêng của hèm rượu đã lên men được biểu thị bằng độ Plato.

Theo sáng chế, mức độ lên men thực (RDF) được xác định từ trọng lượng riêng và nồng độ cồn.

Trọng lượng riêng và nồng độ cồn được xác định trên các mẫu đã được lên men bằng cách sử dụng máy phân tích bia Beer Alcolyzer Plus và máy đo mật độ DMA 5000 (cả hai đều từ hãng Anton Paar, Gratz, Austria). Dựa trên các phép xác định này, giá trị mức độ lên men thực (RDF) được tính toán theo phương trình dưới đây:

$$RDF(\%) = \frac{OE - E(r)}{OE} \times 100$$

Trong đó: E(r) là chất chiết thực tính bằng độ Plato ($^{\circ}P$) và OE là chất chiết ban đầu tính bằng $^{\circ}P$.

Khả năng làm giảm sự gia tăng của điaxetyl và 2,3-pentandion (Điketon kế cận, VDK) trong 7 ngày lên men ở nhiệt độ 14 °C được nghiên cứu bằng cách bổ sung aldB với các hoạt tính ALDC riêng khác nhau (thu được bằng cách thay đổi nồng độ ZnSO_4 trong mẫu) được đưa ra trong bảng 8. Sự cấu thành biến thể aldB: A) hợp phần aldB thô, B) hợp phần aldB thô ZnSO_4 được bổ sung vào canh đã được làm sạch và C) hợp phần aldB thô bao gồm 50 μM ZnSO_4 được bổ sung vào môi trường lên men và 20mM ZnSO_4 vào canh đã được làm sạch.

Bảng 8 Hoạt tính ALDC, nồng độ protein AldB và hoạt tính riêng của mẫu aldB A, B và C.

	Hoạt tính ALDC	Protein aldB	Hoạt tính ALDC riêng
	U/ml	mg/ml	U/mg
biến thể aldB A	426	0,463	919
biến thể aldB B	511	0,463	1103
biến thể aldB C	719	0,463	1552

Các biến thể enzyme được định liều dựa trên hoạt tính ALDC tương tự 0,03 U/ml hèm rượu tạo ra nồng độ khác nhau của protein aldB trong hèm rượu, như được quan sát thấy trong bảng 9. Nồng độ protein AldB trong hèm rượu theo tính toán là 33,4, 28,0 và 19,9 µg/l hèm rượu với việc bổ sung biến thể A, B và C tương ứng.

Bảng 9 Hoạt tính ALDC và protein aldB trong hèm rượu có bổ sung biến thể aldB A, B và C .

	Hoạt tính ALDC	Lượng mẫu để pha loãng sơ bộ	Thể tích pha loãng sơ bộ	Hoạt tính trong hèm rượu	Protein AldB trong hèm rượu
	U/ml	g	ml	U/ml	µg/l
Biến thể aldB A	426	0,721	50	0,03	33,4
Biến thể aldB B	511	0,604	50	0,03	28,0
Biến thể aldB C	719	0,430	50	0,03	19,9

Các quá trình lên men được tiến hành và sự gia tăng VDK được phân tích như được mô tả trên đây. Các quá trình lên men với enzyme được so sánh với đối chứng không bổ sung enzyme. Sự gia tăng VDK được thể hiện trên hình 5.

Cả ba biến thể aldB đều làm giảm sự gia tăng VDK trong quá trình lên men so với đối chứng. Số liệu gợi ý rằng ba biến thể này được thực hiện rất tương tự, tuy nhiên sự tăng VDK ít hơn trong khoảng thời gian lên men từ 20 đến 40 giờ đối với biến thể C so với A và B, nhưng sự tăng này gần với độ lệch chuẩn tương đối của phân tích (RSD bằng 7,5%) Sự giảm VDK tương đối sau 40 giờ lên men là 63,1 %, 58,8 % và 63,2 % đối với biến thể A, B và C tương ứng. Ngoài ra, thời gian lên men cần thiết để đạt đến mức ngưỡng 0,1 mg/ml VDK hoặc thấp hơn, được quan sát thấy là khoảng 112 giờ đối với cả ba biến thể. Do đó, hoạt tính riêng cao hơn của biến thể C so với A hoặc B có thể làm giảm VDK tương tự với ít protein aldB hơn.

Ví dụ 10 - Sự giảm điaxetyl và 2,3-pentandion bởi aldB trong quá trình lên men bia với các nồng độ khác nhau của kẽm trong hèm rượu

Mục đích của phân tích này là để thử nghiệm sự giảm điaxetyl và 2,3-pentandion (Điketon kế cận, VDK) bởi aldB trong 4 ngày lên men ở nhiệt độ 14 °C trong sự có mặt của các mức ZnSO_4 khác nhau trong hèm rượu.

Phân tích quá trình ủ được thiết lập như được mô tả trong ví dụ 9. Dung dịch gốc của ZnSO_4 được tạo ra trong hèm rượu đã được làm lạnh (0,686 g trong 1000 ml hèm rượu) và được cấp vào các mẫu hèm rượu (được điều chế như được mô tả trong ví dụ 9) trước khi lên men dẫn đến tạo ra các nồng độ Zn^{2+} tương ứng như sau: 0, 0,1, 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5,0 và 20,0 ppm. Enzym ALDC và nấm men sau đó được bổ sung vào các mẫu. Hợp phần enzym ALDC được định liều tương tự đối với tất cả các mẫu (0,04 U/ml hèm rượu, tương ứng với 8 đơn vị ALDC cho mỗi 200 g hèm rượu). Mỗi bình thốt cổ lên men hình nón được dùng liều lượng nấm men mới sản xuất W34/70 0,5% (Weiherstephan) (1,0 g nấm men cho 200 g hèm rượu) và phân tích được thực hiện như mô tả trong ví dụ 9. Lên men với enzym được so sánh với đối chứng không được bổ sung enzym. Sự gia tăng VDK được thể hiện trên hình 6.

Tất cả các mẫu được xử lý bằng aldB đều tạo ra sự gia tăng VDK ít hơn trong quá trình lên men so với đối chứng. Việc tăng nồng độ của Zn^{2+} trong mẫu dẫn đến tạo ra VDK ít hơn và sự tăng VDK tạo ra ít hơn. Đặc biệt, việc tăng nồng độ của Zn^{2+} đến 0,5 ppm hoặc nhiều hơn ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính enzym để tránh tạo ra VDK. Việc bổ sung 1 ppm Zn^{2+} hoặc nhiều hơn vào hèm rượu đảm bảo mức VDK dưới ngưỡng hương vị là 0,1 mg/l trong toàn bộ khoảng thời gian lên men.

Mặc dù các phương án ưu của sáng chế đã được thể hiện và được mô tả trong bản mô tả này, sẽ hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các phương án này được đưa ra chỉ theo cách ví dụ. Các cải biến, thay đổi, và thay thế khác nhau sẽ được thực hiện với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không đi trệch khỏi phạm vi của sáng chế. Cần phải hiểu rằng các phương án thay thế khác nhau đối với các phương án theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành sáng chế. Dự định rằng các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây xác định phạm vi của sáng chế và bao hàm các phương pháp và cấu trúc nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ này và các dạng tương đương của chúng.

Tham khảo chéo đến các đơn liên quan

Đơn yêu cầu cấp patent này xin hưởng quyền ưu tiên và quyền lợi của các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 62/165671, nộp ngày 22 tháng 5 năm 2015; 62/166610, nộp ngày 26 tháng 5 năm 2015; và 62/168406, nộp ngày 29 tháng 5 năm 2015; mỗi đơn tạm thời này có tên là "ALDC".

Tham khảo đến danh mục trình tự

Danh mục trình tự được đưa ra trong tệp có tên "20160505_NB40736_PCT_SEQS_ST25.txt" có kích thước 16.666 byte, tệp này được tạo ra vào ngày 5 tháng 5 năm 2016 và được nộp kèm theo đây, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm tăng hoạt tính và/hoặc độ ổn định của enzym ALDC có số EC là 4.1.1.5, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung kẽm vào môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín chứa tế bào chủ sản xuất ALDC trong quá trình lên men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê:

(i) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 300 μM , tốt hơn là từ 6 μM đến 300 μM ; hoặc

(ii) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 50 μM ; hoặc

(iii) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 25 μM , tốt hơn là từ 6 μM đến 25 μM hoặc

(iv) dưới dạng chế phẩm bao gồm ALDC và kẽm, trong đó:

(a) kẽm nêu trên có mặt trong chế phẩm nêu trên ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 5 mM; hoặc

(b) tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong chế phẩm này lớn hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym ALDC và kẽm nêu trên được bổ sung trong quá trình lên men hoặc quá trình ủ chín.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó enzym ALDC được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 g đến 10 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó enzym ALDC được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 g đến 5 g cho mỗi hectolit của men bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hoạt tính của enzym ALDC này nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó enzym ALDC là từ *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis* DX, hoặc *Bacillus licheniformis*, tốt hơn là trong đó enzym ALDC này là từ *Bacillus brevis* hoặc *Bacillus licheniformis*.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, trong đó enzym ALDC có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc mảnh chức năng bất kỳ của chúng.

8. Môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê chứa chế phẩm chứa enzym ALDC có số EC là 4.1.1.5 và kẽm trong đó chế phẩm này chứa kẽm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 200 mM, tốt hơn là trong đó:

(i) kẽm có mặt trong chế phẩm nêu trên ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 300 μM , tốt hơn là từ 6 μM đến 300 μM ; hoặc

(ii) kẽm có mặt trong chế phẩm nêu trên ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 μM đến 50 μM , tốt hơn là từ 6 μM đến 50 μM , hoặc từ 6 μM đến 25 μM ; hoặc

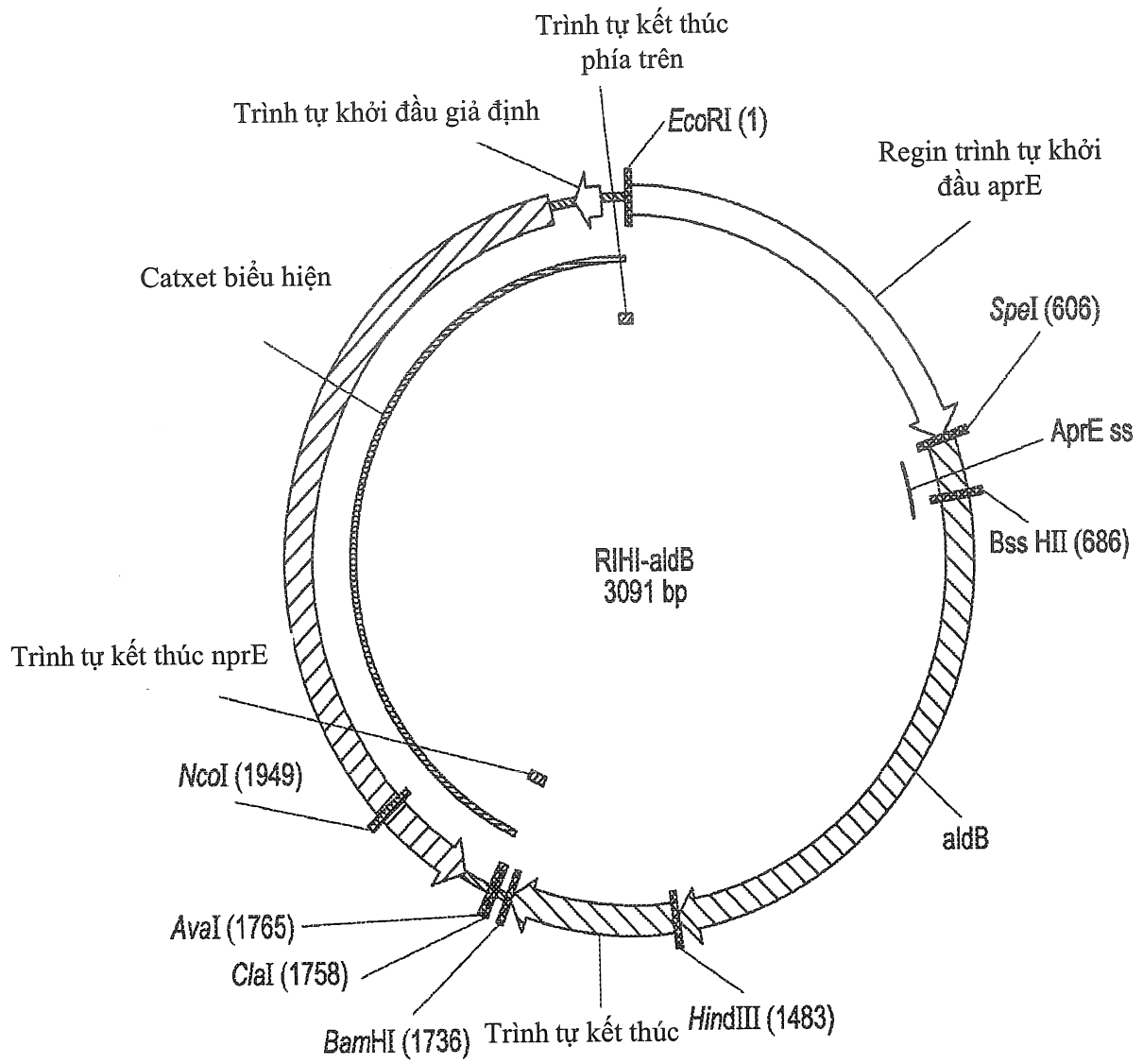
(iii) kẽm và enzym ALDC được bổ sung dưới dạng chế phẩm, trong đó kẽm nêu trên có mặt trong chế phẩm này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 20 mM, tốt hơn là từ 1 mM đến 5 mM; hoặc

(iv) kẽm và enzym ALDC được bổ sung dưới dạng chế phẩm, trong đó tỷ lệ mol của kẽm so với enzym ALDC trong chế phẩm này lớn hơn 1; hoặc 2:1 hoặc lớn hơn; hoặc 10:1 hoặc lớn hơn; hoặc 20:1 hoặc lớn hơn; hoặc 30:1 hoặc lớn hơn; hoặc 60:1 hoặc lớn hơn.

9. Môi trường lên men và/hoặc môi trường ủ chín bia và/hoặc rượu vang và/hoặc rượu táo và/hoặc rượu lê và/hoặc rượu xa-kê theo điểm 8, trong đó hoạt tính của enzym ALDC nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 đơn vị cho mỗi mg protein; và/hoặc các môi trường này còn chứa ít nhất một enzym bổ sung hoặc dẫn xuất của enzym được chọn từ nhóm gồm axetolactat reductoisomerase, axetolactat isomerase, amylase,

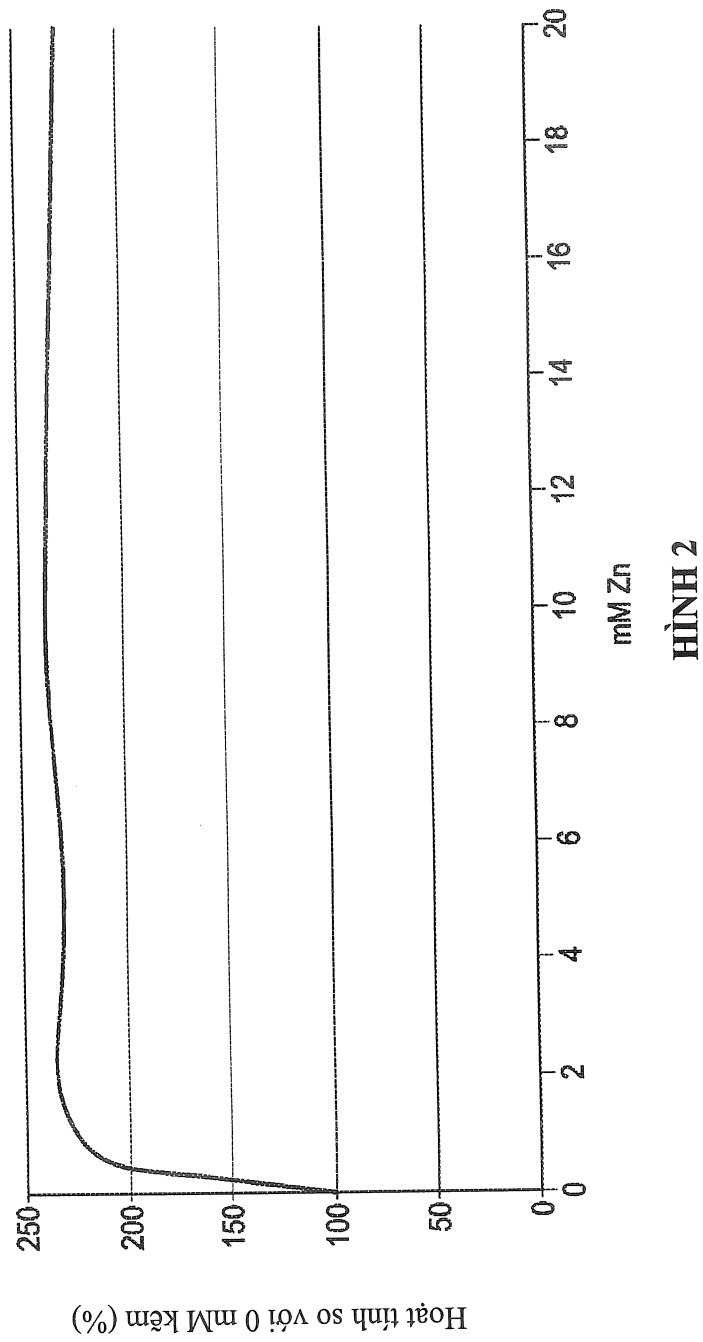
glucoamylaza, hemixenlulaza, xenlulaza, glucanaza, pullulanaza, isoamylaza, endo-glucanaza và enzym hỗ trợ thủy phân beta-glucan có liên quan, xylanaza, enzym hỗ trợ xylanaza (ví dụ, arabinofuranosidaza, esteraza axit ferulic, và xylan axetyl esteraza) và proteaza.

1/7

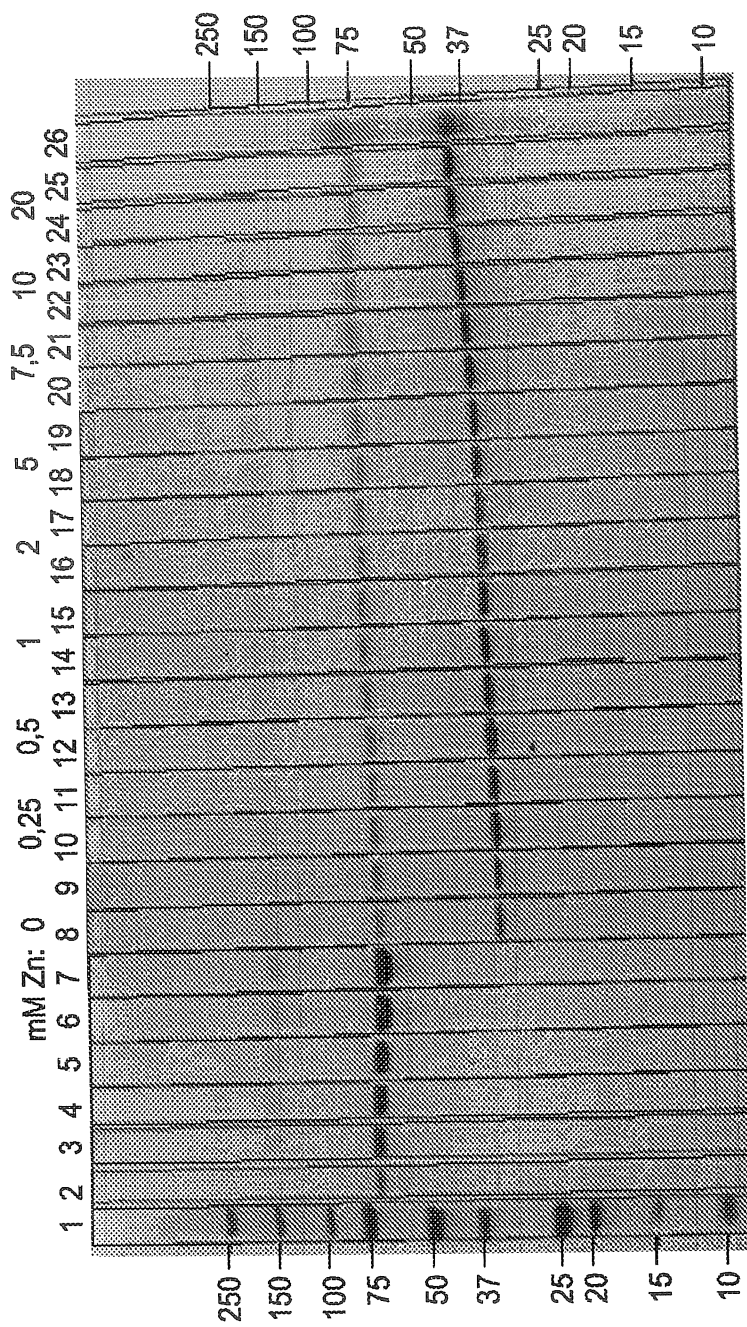


HÌNH 1

2/7



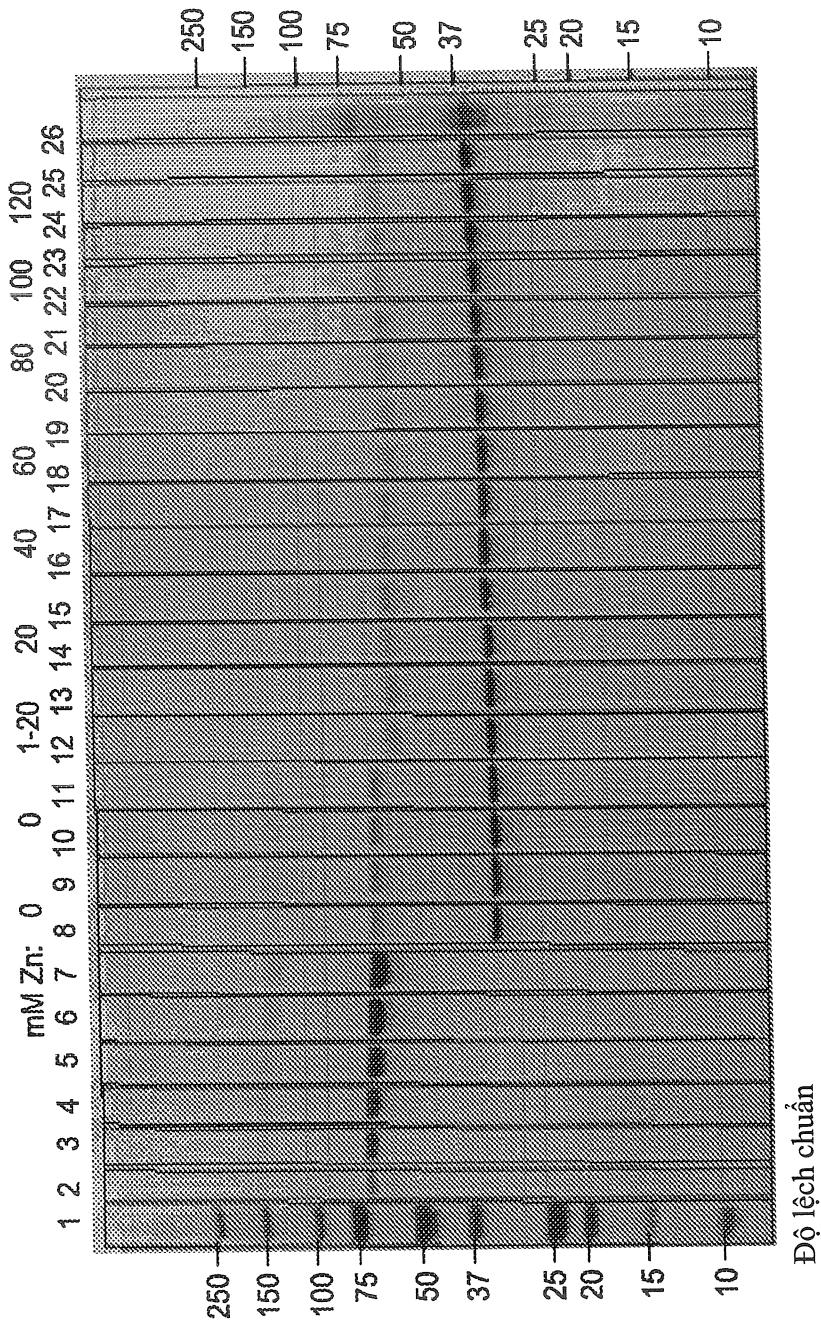
3/7



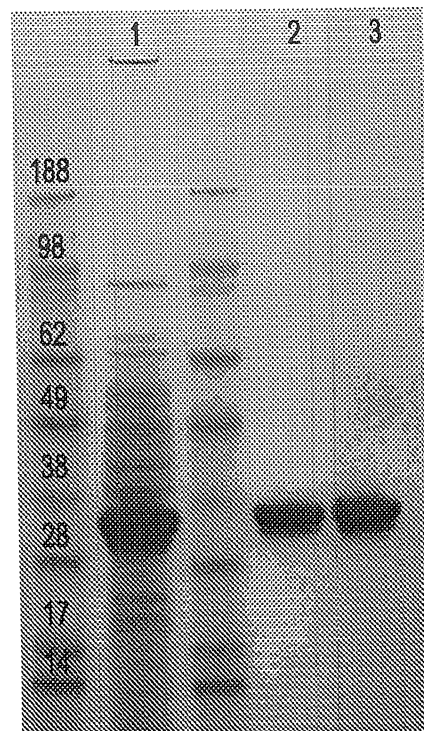
Độ lệch chuẩn

HÌNH 3A

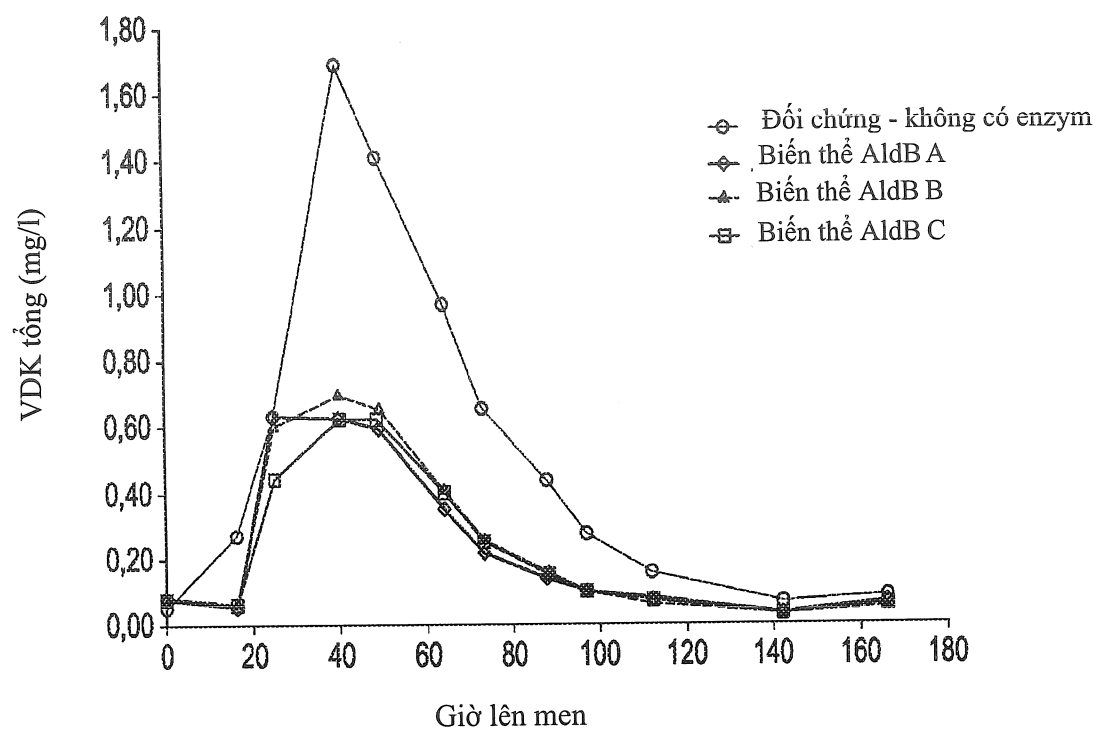
4/7



HÌNH 3B

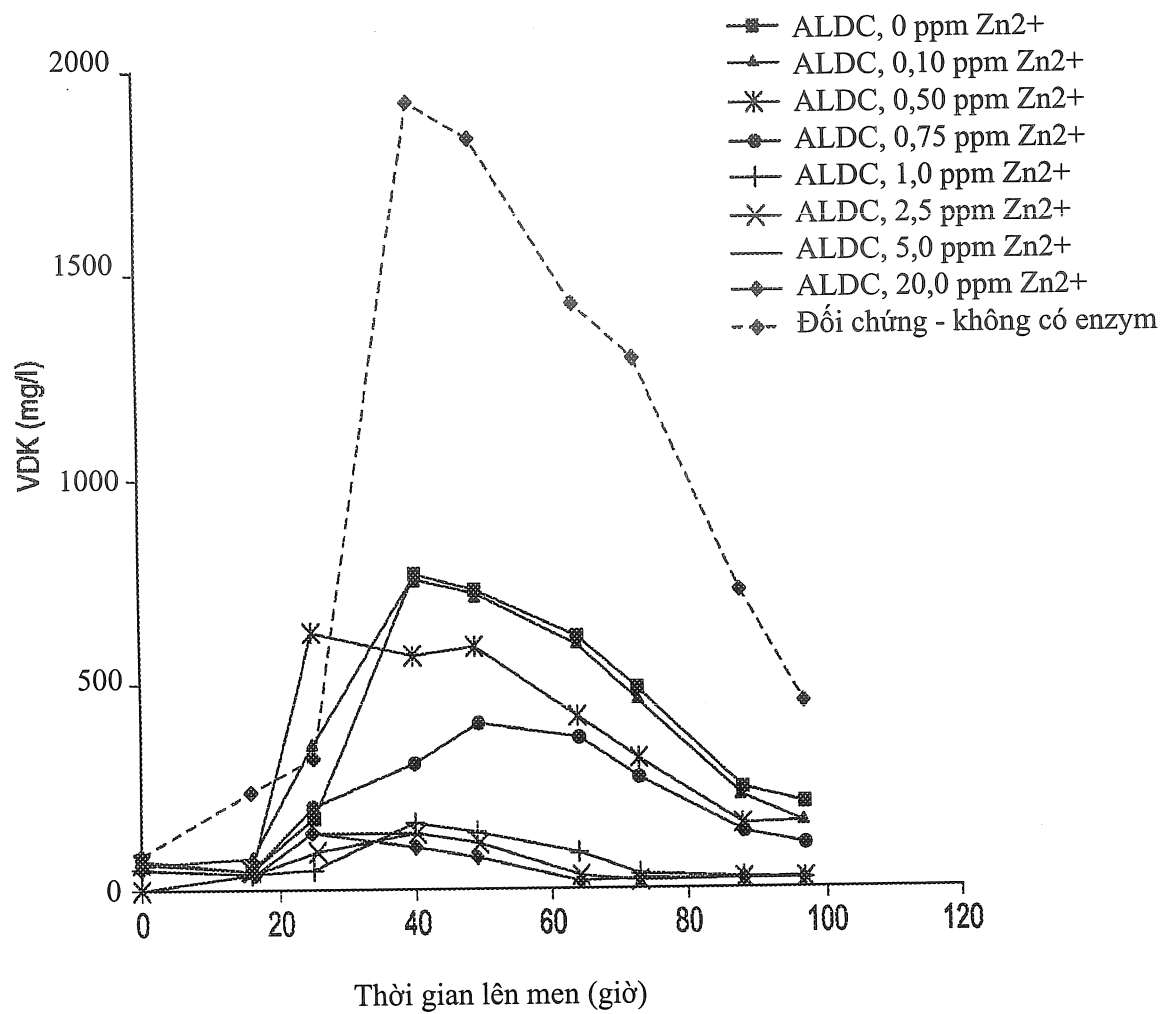
5/7**HÌNH 4**

6/7



HÌNH 5

7/7



HÌNH 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
Cramer, Jacob Flyvholm
Jensen, Lene Bojsen
Kellett-Smith, Anja Hemmingsen
Bladt, Tove
Lee, Sang-Kye
- <120> PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG HOẠT TÍNH VÀ/HOẶC ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA ENZYM AXETOLACTAT
ĐECARBOXYLAZA (ALDC), VÀ MÔI TRƯỜNG LÊN MEN VÀ/HOẶC MÔI TRƯỜNG Ủ CHÍN BIA
VÀ/HOẶC RƯỢU CHỨA ENZYM ALDC NÀY
- <130> NB40736 PCT
- <150> US62/165671
<151> 2015-05-22
- <150> US62/168406
<151> 2015-05-29
- <150> US62/166610
<151> 2015-05-26
- <160> 8
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 858
<212> ADN
<213> Brevibacillus brevis
- <400> 1
atgaaaaaaa atatcatcac ttctatcaca tctctggctc tggttgccgg gctgtctttg 60
actgcttttg cagctacaac ggctactgta ccagcaccac ctgccaaagca ggaatccaaa 120
cctgcggttg ccgctaattc ggacacaaaa aatgtactgt ttcaatactc aacgatcaat 180
gcactcatgc ttggacagtt tgaaggggac ttgactttga aagacctgaa gctgcgagggc 240
gatatggggc ttggtaccat caatgatctc gatggagaga tgattcagat gggatcaaaa 300
ttctaccaga tcgacagcac cggaaaatta tcggagctgc cagaaagtgt gaaaactcca 360
tttgcggtta ctacacattt cgagccgaaa gaaaaaacta cattaaccaa tgtgcaagat 420
tacaatcaat taacaaaaat gcttgaggag aaatttgaaa acaagaacgt cttttatgcc 480
gtaaagctga ccggtacctt taagatggta aaggctagaa cagttccaaa acaaaccaga 540
ccttatccgc agctgactga agtaacaaaa aaacaatccg agtttgaatt taaaaatggt 600
aagggaaacc tgattggctt ctatacgcca aattatgcag cagccctgaa tggtcccgga 660
ttccatctcc acttcatcac agaggataaa acaagtggcg gacacgtatt aaatctgcaa 720
tttgacaacg cgaatctgga aatttctccg atccatgagt ttgatgtaca attgccgcac 780
acagatgatt ttgccactc tgatctgaca caagttacta ctagccaagt acaccaagct 840
gagtcagaaa gaaaataa 858
- <210> 2
<211> 285
<212> PRT

<213> Brevibacillus brevis

<400> 2

Met Lys Lys Asn Ile Ile Thr Ser Ile Thr Ser Leu Ala Leu Val Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala
 20 25 30

Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala
 35 40 45

Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu
 50 55 60

Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly
 65 70 75 80

Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln
 85 90 95

Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu
 100 105 110

Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu
 115 120 125

Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu
 130 135 140

Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro
 165 170 175

Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln
 180 185 190

Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr
 195 200 205

Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu His
 210 215 220

Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln
 225 230 235 240

Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val
 245 250 255

Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys
 275 280 285

<210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Brevibacillus brevis

<400> 3

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45

Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe
 115 120 125

Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys
 130 135 140

Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val
 165 170 175

Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu
 180 185 190

Asn Val Pro Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser
 195 200 205

Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile

1409161ENVI_SEQUENCES

210 215 220

Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe
 225 230 235 240

Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala
 245 250 255

Glu Ser Glu Arg Lys
 260

<210> 4
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự trưởng thành của gen aldB trong plasmit RIHI-aldB

<400> 4

gctacaacgg ctactgtacc agcaccacct gccaaagcagg aatccaaacc tgcggttgcc	60
gctaataccgg caccaaaaaa tgtactgttt caatactcaa cgatcaatgc actcatgctt	120
ggacagtttg aaggggactt gactttgaaa gacctgaagc tgcgaggcga tatggggctt	180
ggtaccatca atgatctcga tggagagatg attcagatgg gtacaaaatt ctaccagatc	240
gacagcaccg gaaaattatc ggagctgcc aagagtgtga aaactccatt tgcggttact	300
acacatttcg agccgaaaga aaaaactaca ttaaccaatg tgcaagatta caatcaatta	360
acaaaaatgc ttgaggagaa atttgaaaac aagaacgtct tttatgccgt aaagctgacc	420
ggtactttta agatggtaaa ggctagaaca gttccaaaac aaaccagacc ttatccgcag	480
ctgactgaag taaccaaaaa acaatccgag tttgaattta aaaatgttaa gggaaccctg	540
attggcttct atacgcaaaa ttatgcagca gccctgaatg ttcccggatt ccatctccac	600
ttcatcacag aggataaaac aagtggcgga cacgtattaa atctgcaatt tgacaacgcg	660
aatctggaaa tttctccgat ccatgagttt gatgttcaat tgccgcacac agatgatttt	720
gcccactctg atctgacaca agttactact agccaagtac accaagctga gtcagaaaga	780
aaa	783

<210> 5
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Protein tiền chất aldB được biểu hiện từ plasmit RIHI-aldB

<400> 5

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu	1 5 10 15
---	-----------

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Thr Thr

20 25 30
 Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val
 35 40 45
 Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile
 50 55 60
 Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp
 85 90 95
 Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr
 100 105 110
 Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val
 115 120 125
 Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln
 130 135 140
 Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys
 145 150 155 160
 Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys
 165 170 175
 Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu
 180 185 190
 Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr
 195 200 205
 Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro
 210 215 220
 Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His
 225 230 235 240
 Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile
 245 250 255
 His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser
 260 265 270
 Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu
 275 280 285
 Arg Lys

290

<210> 6
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự mã hóa cho axetolactat decarboxylaza

<400> 6
 atgaaaaaaa atatcatcac ttctatcaca tctctggctc tcgttgccgg gctgtctttg 60
 actgcttttg cagctacaac ggctactgta ccagcaccac ctgccaagca ggaatccaaa 120
 cctgtgggtg ccgctaattc ggacacaaaa aatgtactgt ttcaatactc aacgatcaat 180
 gcactcatgc ttggacagtt tgaaggggac ttgactttga aagacctgaa gctacgaggc 240
 gatatggggc ttggtaccat caatgatctc gatggagaga tgattcagat gggtacaaaa 300
 ttctaccaga tcgacagcac cggaaaatta tccgagctgc cagaaagtgt gaaaactcca 360
 ttgcggtta ctacacattt cgagccgaaa gaaaaacta cattaaccaa tgtgcaagat 420
 tacaatcaat taacaaaaat gcttgaggag aaatttgaaa acaagaacgt cttttatgcc 480
 gtaaagctga ccggtacctt taagatggta aaggctagaa cagttccaaa acaaaccaga 540
 ctttatccgc agctgactga agtaacaaaa aaacaatccg agtttgaatt taaaaatggt 600
 aagggaaccc tgattggctt ctatacgcca aattatgcag cagccctgaa tgttcccgga 660
 ttccatctcc acttcatcac agaggataaa acaagtggcg gacacgtatt aaatctgcaa 720
 ttgacaacg cgaatctgga aatttctccg atccatgagt ttgatgtaca attgccgcac 780
 acagatgatt ttgcccactc tgatctgaca caagttacta ctagccaagt acaccaagct 840
 gagtcagaaa gaaaataa 858

<210> 7
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của tiền chất aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC)

<400> 7

Met Lys Lys Asn Ile Ile Thr Ser Ile Thr Ser Leu Ala Leu Val Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala
 20 25 30

Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Val Val Ala Ala Asn Pro Ala
 35 40 45

Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu
 50 55 60

Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly
 65 70 75 80
 Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln
 85 90 95
 Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu
 100 105 110
 Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu
 115 120 125
 Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu
 130 135 140
 Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro
 165 170 175
 Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr
 195 200 205
 Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu His
 210 215 220
 Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln
 225 230 235 240
 Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val
 245 250 255
 Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val
 260 265 270
 Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys
 275 280 285

<210> 8
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin dự đoán của aldB axetolactat decarboxylaza (ALDC)
 trưởng thành

<400> 8

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15
 Pro Val Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30
 Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45
 Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn
 50 55 60
 Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80
 Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95
 Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe
 115 120 125
 Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys
 130 135 140
 Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val
 165 170 175
 Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu
 180 185 190
 Asn Val Pro Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser
 195 200 205
 Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile
 210 215 220
 Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe
 225 230 235 240
 Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala
 245 250 255
 Glu Ser Glu Arg Lys
 260