



(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)



1-0023814

(51)⁷

A21D 2/14; C12R 1/865; C12N 15/01; (13) B
A21D 8/04; C12N 1/18

(21) 1-2013-02574

(22) 01/07/2011

(86) PCT/FR2011/051550 01/07/2011

(87) WO2012/110711 23/08/2012

(30) 11 51354 18/02/2011 FR

(45) 25/05/2020 386

(43) 25/11/2013 308A

(73) LESAFFRE ET COMPAGNIE (FR)

41, rue Etienne Marcel, 75001 Paris, France

(72) LADRIERE, Jean-Marc (FR); BARTOLUCCI, Jean-Charles (FR); SUCHER, Fabienne (FR); THOMAS, Benoit (FR)

(74) Công ty TNHH Sở hữu công nghiệp Sao Bắc Đẩu (SAO BAC DAU IP CO.,LTD)

(54) CHỦNG SACCHAROMYCES CEREVISIAE THÍCH HỢP ĐỂ SẢN XUẤT NẤM MEN BÁNH MỠ CHỊU ĐƯỢC ÁP SUẤT THÂM THẤU VÀ CÓ TÍNH KHÁNG NỘI ĐỐI VỚI AXIT HỮU CƠ YẾU VÀ NẤM MEN BÁNH MỠ THU ĐƯỢC TỪ CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Saccharomyces cerevisiae* thích hợp để sản xuất nấm men bánh mỳ chịu được áp suất thẩm thấu và có tính kháng nội đối với axit hữu cơ yếu.

Các chủng theo sáng chế được thu bằng quy trình lai hoặc gây đột biến đối với chủng *S. cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 8-7-2010 tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (CNCM - French National Collection of Microorganism Cultures) với số hiệu lưu giữ I-4341, hoặc từ chủng công nghiệp liên quan với nó thông qua profin Ty và/hoặc thông qua việc lập bản đồ vị trí tính trạng số lượng (lập bản đồ QTL).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ, phương pháp sản xuất, nấm men bánh mỳ được sản xuất từ chủng này, bột nhào bánh mỳ chứa chủng này và phương pháp sản xuất bánh mỳ và các sản phẩm bánh mỳ có thể thu được bằng cách sử dụng bột nhào này. Đặc biệt, theo khía cạnh chung nhất, sáng chế đề cập đến chủng *Saccharomyces cerevisiae* “công nghiệp” có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ chịu được áp suất thẩm thấu và có tính kháng nội đối với axit hữu cơ yếu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

WO 96/38538 bộc lộ nấm men thu được từ chủng *S. cerevisiae* được cải thiện chịu được áp suất thẩm thấu cao ở chỗ chúng thải khí (sản sinh CO₂) có lợi trong bột nhào bánh mỳ chứa đường với nồng độ cao nằm trong khoảng từ 16% đến 25% (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột - baker's percentages). Tài liệu này không đề cập đến tập tính của nấm men khi có mặt chất ức chế mốc, như các axit hữu cơ yếu.

US 4 318 991 bộc lộ quy trình sản xuất nấm men bánh mỳ có hoạt tính lên men cao trong bột nhào bánh mỳ ngay cả khi có mặt tác nhân ức chế mốc, như các axit hữu cơ yếu, ví dụ, axit axetic hoặc axit propionic. Quy trình này bao gồm bước bổ sung axit nêu trên, cụ thể là trong quá trình sinh sản của nấm men, ở giai đoạn cuối của quá trình sinh sản để nấm men “thích ứng” với axit nêu trên, cụ thể là có mặt ở dạng canxi propionat (sau đây ký hiệu là Calpro hoặc cpp) trong bột nhào bánh mỳ. Tài liệu này không chỉ rõ tập tính của nấm men sản xuất được theo cách đó trong bột nhào có hàm lượng đường cao.

US 4 346 115, đứng tên người nộp đơn, mô tả quy trình sản xuất nấm men bánh mỳ kháng các axit hữu cơ yếu, từ chủng chịu được áp suất thẩm thấu, bằng cách bổ sung không liên tục rỉ đường trong chu kỳ sinh sản cuối.

EP 1559322, cũng đứng tên người nộp đơn, bộc lộ chủng để sản xuất, sau khi thích ứng với các axit yếu, nấm men mà hữu hiệu hơn, theo các thử nghiệm được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, và chủng đối chứng đã được tham khảo trong khoảng hai mươi năm để thu được nấm men thương mại hữu hiệu đối với bột nhào ngọt khi có mặt chất ức chế mốc.

Ngoài sự thích nghi với axit yếu nêu trên, ở dạng canxi propionat chẳng hạn, trong quá trình sinh sản của nấm men, gây tổn chi phí nhất định, việc gây thích ứng này còn ảnh hưởng không tốt đến hoạt tính lên men của nấm men, cụ thể là khi có mặt bột nhào ngọt hoặc có độ ngọt cao.

Điểm chung không hợp lý của các kỹ thuật đã biết này nhằm cải thiện tính kháng của nấm men bánh mỳ đối với các axit yếu ức chế mốc trong bột nhào bánh mỳ ngọt hoặc không ngọt, bằng cách cho các chủng đã được tạo ra thích ứng với các axit yếu nêu trên, nghĩa là chúng chỉ làm cho nấm men kháng axit yếu một cách tạm thời/ngắn ngủi và không lâu dài. Sự thích ứng bao gồm việc cho tế bào nấm men tiếp xúc với axit yếu với lượng dưới mức gây chết ở giai đoạn sinh trưởng; việc tiếp xúc trước này sẽ cho phép tế bào đã thích ứng chịu được sự có mặt của axit yếu tương tự tốt hơn khi chúng được đặt trong các điều kiện lên men. Trong một số trường hợp, axit yếu đã nêu có thể làm thích ứng đối với sự có mặt sau đó của axit yếu khác ở giai đoạn lên men. Các lưu ý này được minh họa bằng ví dụ trong bài báo của Ferreira và các đồng tác giả (1997), *International Journal of Food Microbiology* 36, 145-153. Các cơ chế thích ứng với axit yếu là chủ đề của một số nghiên cứu. Một số nghiên cứu này được so sánh trong bài báo của Piper và các đồng tác giả (2001) *Microbiology* 147, 2635-2642. Bài báo cho rằng sự thích ứng này dựa trên các cơ chế của tế bào liên quan đến một số protein, bao gồm một số bơm của màng. Các cơ chế này không di truyền và chủ yếu là tạm thời: chúng được tế bào thiết lập để phản ứng với áp lực được tạo ra bởi axit yếu, song biến mất khi áp lực này không còn: tế bào đã được làm thích ứng trước đó trở lại trạng thái tế bào không được làm thích ứng.

Các quy trình khác phức tạp hơn nhiều, như được mô tả trong EP 645094 hoặc WO 99/51746, bộc lộ việc cải biến di truyền các chủng có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ để làm cho chúng có tính kháng nội đối với axit yếu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Người nộp đơn, bằng cách tiếp tục nghiên cứu để tìm kiếm chủng hữu hiệu hơn, lưu ý rằng chủng cụ thể thu được từ tập hợp các chủng nội tại chịu được áp suất thẩm thấu có tính di truyền sao cho nếu nó được lai hoặc đột biến, theo các quy trình thông thường khác, sẽ tạo ra chủng có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ đặc biệt hữu hiệu và, hoàn toàn ngạc nhiên là, không cần sự thích ứng bất kỳ trước khi nó được đưa vào bột nhào có độ ngọt cao chứa axit yếu ở dạng canxi propionat (ký hiệu là Calpro hoặc cpp) chẳng hạn.

Do đó, theo khía cạnh chung nhất, sáng chế đề xuất quy trình điều chế chủng *S. cerevisiae* có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ chịu được áp suất thẩm thấu và có tính kháng nội đối với axit hữu cơ yếu, từ chủng công nghiệp *S. cerevisiae* lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - CNCM [French National Collection of Microorganism Cultures], Institut Curie, 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) với số hiệu lưu giữ I-4341, hoặc từ chủng công nghiệp liên quan với nó thông qua profin Ty và/hoặc thông qua việc lập bản đồ vị trí tính trạng số lượng (quantitative trait locus mapping - QTL mapping).

Theo hiểu biết của người nộp đơn, đây là lần đầu tiên quy trình sản xuất nấm men bánh mỳ được đề xuất, quy trình này làm cho nấm men chịu được áp suất thẩm thấu và có tính kháng nội đối với axit yếu so với việc điều chế bằng các quy trình đất đỏ và/hoặc phức tạp đã biết.

Theo phương án thứ nhất của quy trình theo sáng chế, quy trình sản xuất này bao gồm bước lai chủng công nghiệp nêu trên và ít nhất một bước chọn chủng lai thu được, được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) Hoạt tính lên men, đo được bằng thiết bị đo men Burrows và Harrison bằng ít nhất thử nghiệm A5' hoặc các thử nghiệm A5 và A5', chủng lai được chọn sao cho mức giải phóng khí của nó lớn hơn ít nhất là 10%, tốt hơn là ít nhất 15% đến 25%, so với mức giải phóng khí của chủng đối chứng gồm chủng *S. cerevisiae* được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341;
- (ii) Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 18% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4%

canxi propionat, các chủng lai được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 85% đến 105% và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mỳ đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên;

- (iii) Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 23% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, các chủng lai được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 85% đến 105% và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mỳ đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp lưu giữ ngày 8-7-2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên;
- (iv) Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 25% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, các chủng lai được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 85% đến 105% và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mỳ đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp lưu giữ ngày 8-7-2010 tại CNCM [French National Collection of Microorganism Cultures] với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất các chủng lai sau thu được từ chủng I-4341:

- Chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ ngày 11 tháng 05 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4312

và

- Chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ ngày 11 tháng 05 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4313.

Theo phương án thứ hai của quy trình theo sáng chế, quy trình này bao gồm bước gây đột biến chủng *S. cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341, hoặc chủng liên quan với nó thông qua profin Ty và/hoặc thông qua việc lập bản đồ vị trí tính trạng số lượng (lập bản đồ QTL) và ít nhất một bước chọn chủng đột biến thu được, được chọn từ nhóm bao gồm:

- Hoạt tính lên men, đo được bằng thiết bị đo men Burrows và Harrison bằng thử nghiệm A5'; chủng đột biến được chọn sao cho mức giải phóng khí của nó lớn hơn ít nhất là từ 5% đến 20% so với mức giải phóng khí của chủng đối chứng gồm chủng *S. cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341;
- Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 15% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, chủng đột biến được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mì bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mì đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên;
- Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 18% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, chủng đột biến được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh

mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 90% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mỳ đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên;

- (iv) Thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 23% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, chủng đột biến được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 90% đến 105% thời gian kiểm chứng của nấm men bánh mỳ đối chứng sản xuất được từ chủng *S. cerevisiae* công nghiệp lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản với sự thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất các chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ ngày 08 tháng 12 năm 2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với các số hiệu lưu giữ I-4409 và I-4410.

Sáng chế cũng đề xuất nấm men bánh mỳ có thể thu được bằng cách cho chủng theo sáng chế sinh sản, mà không cho thích ứng với sự có mặt của axit yếu, hoặc thu được bằng quy trình theo sáng chế.

Các tác giả sáng chế lưu ý rằng khi nấm men bánh mỳ nêu trên được sản xuất có sự thích ứng thì lợi ích của việc giảm thời gian kiểm chứng được gia tăng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất:

- Bột nhào bánh mỳ chứa nấm men bánh mỳ như được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế;

- Tốt hơn, nếu bột nhào bánh mỳ nêu trên được chọn từ các bột nhào trong đó quá trình lên men được thực hiện cả với sự có mặt của áp suất thẩm thấu do sự có mặt của ít nhất 15% đường, tốt hơn là ít nhất 18% đường, tốt hơn là ít nhất 23% đường và tốt hơn là ít nhất 25% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) lẫn với sự có mặt của chất ức chế mốc thuộc loại axit hữu cơ yếu, tốt hơn là ở dạng canxi propionat.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình chế biến sản phẩm bánh mì bằng cách sử dụng bột nhào bánh mì nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm bánh mì thu được bằng quy trình chế biến nêu trên.

Các đặc điểm và ưu điểm khác sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn bằng các phương án được lấy làm ví dụ theo sáng chế, các phương án này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ "nấm men bánh mì chịu được áp suất thẩm thấu" được dùng để chỉ nấm men có ít nhất một trong số các đặc tính sau:

- Hoạt tính invertaza nhỏ hơn 35 đơn vị, tốt hơn là nhỏ hơn 30 đơn vị và thậm chí tốt hơn là nhỏ hơn 20 đơn vị, đơn vị invertaza được xác định là mức tạo ra một micromol đường khử trong 5 phút/mg chất khô nấm men ở 30°C và ở độ pH = 4,7 mà không gây co nguyên sinh nấm men, tức là một nửa micromol sucroza nghịch đảo (thử nghiệm được mô tả trong patent Mỹ số US 4 318 929);
- Vượt qua ít nhất một trong số các thử nghiệm sau bằng thiết bị đo men Burrows và Harrison được mô tả trong "Journal of Institute of Brewing", vol. LXV, No. 1, January-February 1959 và các thử nghiệm được xác định trong patent châu Âu số EP 1559322 là A5, A5', A6 và A6';
- Vượt qua ít nhất một trong số các thử nghiệm sản xuất bánh mì so với chủng I-4341 thích ứng và luôn có mặt, trong bột nhào bánh mì, 0,4% canxi propionat và hàm lượng đường cao, các thử nghiệm này, theo sáng chế, được ký hiệu là NT15%+, NT18%+, NT23%+, NT25%+: chúng tương ứng với các số đo về thời gian kiểm chứng trong các sơ đồ "No-Time Dough", tức là các quy trình trực tiếp trong đó thực tế không có quá trình lên men trước giữa bước nhào mạnh và phân chia bột nhào, các miếng bột nhào thu được được lên men trong khuôn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 40°C. Quá trình lên men sau, là quá trình lên men thiết yếu trong quy trình này, được gọi là "kiểm chứng". Thời gian kiểm chứng được xác định là thời gian cần để bột nhào bánh mì đạt tới trọng lượng xác định trong khuôn, tương ứng với sự phát triển mong muốn của bột nhào để nó được đặt vào lò.

Tốt hơn, nếu nấm men chịu được áp suất thẩm thấu theo sáng chế có hai trong số các đặc tính như được xác định trong các thử nghiệm nêu trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ "tính kháng nội của nấm men đối với axit hữu cơ yếu có mặt, ví dụ, ở dạng canxi propionat" có nghĩa là tính kháng không được tạo ra, bằng cách thích ứng chẳng hạn, hoặc không thu được sau khi cải biến di truyền nấm men nêu trên mà không phải bằng cách lai hoặc gây đột biến chủng mà từ đó nấm men nêu trên được tạo ra và như được chỉ ra dưới đây.

Theo sáng chế, thuật ngữ "chủng công nghiệp" dùng để chỉ chủng, không giống như các chủng "phòng thí nghiệm", không nhất thiết phải là đơn bội hoặc lưỡng bội, song mức bội thể của nó thường phức tạp hơn.

Theo sáng chế, thuật ngữ "profin Ty" của chủng có nghĩa là profin bất kỳ thu được bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi đi theo hướng các trình tự đích tương ứng với các "sẹo" di truyền tạo ra từ các vận động của các gen nhảy (transposon (Ty)). Có khoảng 100 bản sao của các trình tự này trong hệ gen của *Saccharomyces cerevisiae*, cụ thể hơn là trong các trình tự gần với các gen mã hóa ARN vận chuyển. Số lượng và sự phân bố trên hệ gen của các yếu tố Ty có thể khác nhau giữa các chủng và điều đó lý giải tính đa hình đáng kể giữa các chủng. Kỹ thuật này hiện được mô tả trong DIN CEN/TS 15790 chuẩn (03/2009) để nhận biết nấm men probiotic dùng làm thức ăn động vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ "lập bản đồ vị trí đặc trưng số lượng (lập bản đồ QTL)" có nghĩa là kỹ thuật bao gồm việc xây dựng bản đồ di truyền dùng để định vị (các vùng của nhiễm sắc thể) liên quan đến sự thay đổi của các đặc trưng số lượng liên kết với các vị trí dễ nhận biết hơn, các yếu tố đánh dấu.

Theo sáng chế, tất cả các tỷ lệ phần trăm nêu trong các thử nghiệm chọn lọc, trừ khi có quy định khác, đều là tỷ lệ phần trăm "bánh mỳ", được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ; các tỷ lệ phần trăm này là tỷ lệ phần trăm trọng lượng của các thành phần (ví dụ, đường, canxi propionat, v.v.) có mặt so với trọng lượng của bột là 100%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất chủng lai

Các chủng lai I-4312 và I-4313, là các đối tượng của sáng chế, được tạo ra bằng các phép lai hệ thống giữa các chủng với nhau của bộ sưu tập nội bộ của người nộp đơn, được chọn để chịu được áp suất thẩm thấu và/hoặc chịu được áp suất thẩm thấu và rất không mẫn cảm nhiều với sự có mặt của các axit hữu cơ yếu hoặc muối của chúng, được dùng làm chất ức chế mốc, như các chủng được lưu giữ tại Bảo tàng giống vi sinh vật Pháp (Collection Nationale de Culture de Microorganismes) có địa chỉ tại Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, vào ngày 08 tháng 07 năm 2010 với số hiệu lưu giữ I-4341 và vào ngày 9-2-2011 với số hiệu lưu giữ I-4448.

Chương trình lai được thực hiện theo các kỹ thuật thông thường như các kỹ thuật được mô tả trong bài báo "Techniques and Protocols" ở các chương 21 đến 23 của cẩm nang "Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000 Edition" của D. Burke, D. Dawson và T. Stearns, Cold Spring Harbor Laboratory Press (ISBN 0-87969-588-9).

Ví dụ 2: Sản xuất nấm men theo sáng chế từ các chủng lai của ví dụ 1

Để sản xuất nấm men bánh mỳ theo sáng chế, các chủng lai thu được ở ví dụ 1 được nuôi cấy trong bình hoặc bình lên men trong môi trường đã biết, nhưng không chứa axit yếu.

Trong các bình, có thể sử dụng môi trường nuôi cấy YPD như được mô tả trong phụ lục A là các môi trường nuôi cấy nêu trong cẩm nang "Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000 Edition" của D. Burke, D. Dawson và T. Stearns, Cold Spring Harbor Laboratory Press (ISBN 0-87969-588-9).

Trong bình lên men, thông thường là, các điều kiện nuôi cấy được sử dụng sao cho sự trao đổi chất về cơ bản là hô hấp và/hoặc sao cho về cơ bản là không sản sinh etanol.

Thuật ngữ "về cơ bản là" có nghĩa là các điều kiện này được xác nhận trong toàn bộ thời gian nuôi cấy, nhưng có khả năng, theo thời gian, các điều kiện này không được xác nhận trong phương thức mẻ cấp liệu, ví dụ, trong những giờ đầu nuôi cấy tương ứng với thời gian nằm trong khoảng từ 1/4 đến 1/3 thời gian nuôi cấy, và cụ thể là trong 5 giờ đầu nuôi cấy theo phương thức mẻ cấp liệu.

Thuật ngữ "sự trao đổi chất về cơ bản là hô hấp" có nghĩa là cacbon được oxy hóa, và không được lên men, trong toàn bộ thời gian nuôi cấy, một phần cacbon có thể được lên men tạm thời.

Thuật ngữ "về cơ bản là không sản sinh etanol" có nghĩa là nồng độ etanol vào cuối quá trình lên men nhỏ hơn 1%, tốt hơn là nhỏ hơn 0,1%, tốt hơn là nhỏ hơn 0,01% và tốt hơn là nhỏ hơn 0,001%.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết cách điều chỉnh các thông số để nuôi cấy nấm men nhất định để các điều kiện nuôi cấy được sử dụng sao cho sự trao đổi chất về cơ bản là hô hấp và/hoặc sao cho về cơ bản là không sản sinh etanol.

Chủng nấm men theo sáng chế được sử dụng với sự có mặt của môi trường nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí.

Tốt hơn, nếu chủng nấm men theo sáng chế được sử dụng với sự có mặt của môi trường nuôi cấy trong bình lên men thích hợp để sản xuất nấm men. Thể tích bình lên men có thể nằm trong khoảng từ vài mililit đến vài mét khối.

Bình lên men này còn gọi là bình phản ứng.

Tốt hơn, nếu bình lên men là thích hợp để nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí.

Tốt hơn, nếu chủng nấm men này được sử dụng với sự có mặt của môi trường nuôi cấy trong trường hợp nuôi cấy theo phương thức mẻ cấp liệu và/hoặc theo phương thức liên tục.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nuôi cấy theo phương thức mẻ cấp liệu" hoặc "nuôi cấy mẻ cấp liệu" hoặc "phương thức mẻ cấp liệu" chỉ việc nuôi cấy trong bình lên men được cấp môi trường nuôi cấy một cách từ từ, nhưng không rút thể tích môi trường. Trong quy trình này, thể tích nuôi cấy thay đổi (và gia tăng) trong bình lên men. Tốc độ dòng cấp liệu trong quá trình nuôi cấy theo phương thức mẻ cấp liệu là không đổi hoặc thay đổi.

Ví dụ về việc nuôi cấy mẻ cấp liệu là việc nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện được mô tả trong sách tham khảo "Yeast Technology", 2nd edition, 1991, G. Reed và T. W. Nagodawithana, do Van Nostrand Reinhold công bố, ISBN 0-442-31892-8.

Các thành phần môi trường nuôi cấy bao gồm hỗn hợp của đường và các yếu tố khác cần cho quá trình sinh trưởng của nấm men.

Các yếu tố khác cần cho quá trình sinh trưởng của nấm men là: ít nhất một nguồn nitơ, ít nhất một nguồn lưu huỳnh, ít nhất một nguồn phospho, ít nhất một nguồn vitamin và/hoặc ít nhất một nguồn chất khoáng.

Các yếu tố khác này được cấp với lượng đủ để không tạo ra yếu tố giới hạn quá trình sinh trưởng của nấm men.

Nguồn nitơ được cấp, ví dụ, ở dạng amoni sulfat, amoni hydroxit, diamoni phosphat, amoniac, ure và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn lưu huỳnh được cấp, ví dụ, ở dạng amoni sulfat, magie sulfat, axit sulfuric và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn phospho được cấp, ví dụ, ở dạng axit phosphoric, kali phosphat, diamoni phosphat, monoamoni phosphat và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn vitamin được cấp, ví dụ, ở dạng rỉ đường, dịch thủy phân nấm men, dung dịch chứa vitamin tinh khiết hoặc hỗn hợp của các vitamin tinh khiết và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn vitamin cung cấp cho nấm men tất cả các vitamin với lượng ít nhất là tương đương với lượng được khuyến cáo trong các cảm nang tham khảo. Một số nguồn vitamin có thể được kết hợp.

Nguồn chất khoáng được cấp, ví dụ, ở dạng rỉ đường, hỗn hợp muối khoáng và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn chất khoáng cung cấp cho nấm men tất cả các yếu tố đa lượng và vi lượng với lượng ít nhất là tương đương với lượng được khuyến cáo trong các cảm nang tham khảo. Một số nguồn chất khoáng có thể được kết hợp.

Một chất và chất tương tự có thể cung cấp một số yếu tố khác nhau.

Các điều kiện sản xuất nấm men bánh mỳ trong bình lên men được giải thích chi tiết bởi A. Loiez trong chương "Production of baker's yeast by biotechnology" of the Techniques de l'Ingénieur [Techniques for the Engineer], Reference J6013, ngày 10-3-2003.

Môi trường nuôi cấy tương tự của các chủng lai theo sáng chế là dùng cho chủng so sánh I-4341, nhưng trong quá trình thực hiện, liên quan đến chủng so sánh này, bước "thích ứng" bổ sung theo các kỹ thuật được mô tả trong patent Mỹ số US 4 318 991 hoặc US 4 346 115 hoặc theo cách kết hợp hai tài liệu này.

Quy trình điều chế nấm men bánh mỳ bao gồm ít nhất hai bước đầu tiên của tập hợp gồm các bước sau của quy trình:

- cho chủng thuần sinh sản trong điều kiện bán hiếu khí và tiếp theo là trong điều kiện hiếu khí,
- tách, bằng cách ly tâm, nấm men sản xuất được theo cách nêu trên từ môi trường nuôi cấy, để tạo ra “nấm men dạng kem” lỏng chứa chất khô với lượng nằm trong khoảng từ 14 đến 25%, hoặc nhiều hơn nếu nấm men dạng kem này được trộn với các sản phẩm thâm thấu,
- lọc nấm men dạng kem lỏng thu được, tốt hơn là bằng bộ lọc quay trong chân không, và tạo ra nấm men tươi loại nước chứa chất khô với lượng nằm trong khoảng từ 26 đến 35%,
- trộn nấm men thu được nêu trên, thậm chí ở dạng bánh nấm men tươi, hoặc ở dạng mảnh nấm men tươi chứa chất khô với lượng khoảng 30%, hoặc ở dạng hạt, tốt hơn là dạng cốm, nếu dự định sấy khô nấm men,
- sấy khô, một cách sơ bộ, bằng dòng khí nóng, ví dụ, hóa lỏng hạt nấm men thu được bằng cách ép đùn,
- đóng gói trước khi đưa ra thị trường.

Ví dụ 3: So sánh hiệu quả của nấm men không được thích ứng theo sáng chế với chủng đối chứng được thích ứng

Ví dụ 3.1: Các thử nghiệm

3.1.1. Thử nghiệm với máy đo men

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng máy đo men Burrows và Harrison được mô tả trong "Journal of Institute of Brewing", vol. LXV, No. 1, January-February 1959 và được xác định theo cách sau:

Thử nghiệm A5

Huyền phù nấm men được điều chế theo cách sau:

1. 200mg chất khô nấm men cần thử
2. 5ml dung dịch chứa 108g/l NaCl và 16g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3. Đong thể tích đến 20ml bằng nước cất.

15ml huyền phù nêu trên (tức là 150mg chất khô nấm men) được cân bằng ở nhiệt độ 30°C trong 15 phút. Hỗn hợp gồm 20g bột và 4g sucroza được cân bằng trước qua đêm ở 30°C được thêm vào huyền phù này. Toàn bộ hỗn hợp được làm đồng nhất trong 35 giây.

Bột nhào thu được được ủ trong vật chứa bịt kín ở 30°C. Mức giải phóng khí (tính bằng ml ở 760mmHg) được ghi lại trong tổng thời gian 120 phút (khoảng thời gian này có thể được điều chỉnh).

Thử nghiệm A5'

Quy trình giống với A5 ngoại trừ:

1. 500µl dung dịch chứa 16% (trọng lượng/thể tích) canxi propionat (calpro) được thêm lên hỗn hợp bột + đường ngay trước giai đoạn trộn 35 giây.

Thử nghiệm A5''

Quy trình giống với A5 ngoại trừ:

1. 1ml dung dịch chứa 16% (trọng lượng/thể tích) canxi propionat được thêm lên hỗn hợp bột + đường ngay trước giai đoạn trộn 35 giây.

Thử nghiệm A6

Quy trình giống với PS4g ngoại trừ:

1. Huyền phù nấm men được điều chế với 400mg chất khô (thay vì 200mg), để có 300mg chất khô nấm men dùng trong thử nghiệm.
2. Hỗn hợp bột + đường gồm 25g bột (thay vì 20g) và 6,5g sucroza (thay vì 4g).

Các thử nghiệm A51 và A51' (với canxi propionat)

Đối với nấm men tươi

Huyền phù nấm men được điều chế theo cách sau:

1. 400mg chất khô nấm men cần thử nghiệm.
2. Trộn với thể tích nước cất cần để có tổng thể tích nước 6,8ml có tính đến lượng nước trong nấm men tươi (thường chiếm 70% trọng lượng nấm men ép).
3. Cân bằng ở 30°C trong 22 phút.
4. Thêm 4,5ml dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl và làm đồng nhất.

20g bột và 3g sucroza được thêm vào huyền phù nêu trên. Trộn hỗn hợp trong 35 giây.

Mức giải phóng khí (tính bằng ml ở 760mmHg) được ghi lại trong tổng thời gian 120 phút (khoảng thời gian này có thể được điều chỉnh). Tiến hành đo ở 36 phút sau khi bắt đầu quy trình.

Quy trình này là dạng cải tiến với sự có mặt của canxi propionat. Trong trường hợp này, ở bước 4 của quy trình điều chế huyền phù nấm men, dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl còn chứa 17,4g/kg canxi propionat.

Đối với nấm men khô

Trộn 20g bột, 3g sucroza và 400mg chất khô nấm men cần thử. Cân bằng ở 30°C trong 12 phút.

Thêm 6,8ml nước cất và 4,5ml dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl và làm đồng nhất trong 35 giây.

36 phút sau khi thêm nước cất, thực hiện bước làm đồng nhất thứ hai giống như bước làm đồng nhất đầu tiên.

Mức giải phóng khí (tính bằng ml ở 760mmHg) được ghi lại trong tổng thời gian 120 phút (khoảng thời gian này có thể được điều chỉnh). Tiến hành đo ở 60 phút sau khi bắt đầu quy trình.

Các thử nghiệm A61 và A61' (với canxi propionat)

Đối với nấm men tươi

Huyền phù nấm men được điều chế theo cách sau:

1. 700mg chất khô nấm men cần thử.
2. Trộn với thể tích nước cất cần để có tổng thể tích nước 7,5ml có tính đến lượng nước trong nấm men tươi (thường chiếm 70% trọng lượng nấm men ép).
3. Cân bằng ở 30°C trong 22 phút.
4. Thêm 5,75ml dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl và làm đồng nhất.

Thêm 25g bột và 6,5g sucroza vào huyền phù nêu trên.

Trộn hỗn hợp trong thời gian 35 giây.

Mức giải phóng khí (tính bằng ml ở 760mmHg) được ghi lại trong tổng thời gian 120 phút (khoảng thời gian này có thể được điều chỉnh). Tiến hành đo ở 36 phút sau khi bắt đầu quy trình.

Quy trình này là dạng cải tiến với sự có mặt của canxi propionat. Trong trường hợp này, ở bước 4 của quy trình điều chế huyền phù nấm men, dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl còn chứa 17,4g/kg canxi propionat.

Đối với nấm men khô

Trộn 25g bột, 6,5g sucroza và 700mg chất khô nấm men cần thử nghiệm. Cân bằng ở 30°C trong 12 phút.

Thêm 7,5ml nước cất và 5,75ml dung dịch chứa 73,6g/kg NaCl và làm đồng nhất trong 35 giây.

36 phút sau khi thêm nước cất, thực hiện bước làm đồng nhất thứ hai giống như bước làm đồng nhất đầu tiên.

Mức giải phóng khí (tính bằng ml ở 760mmHg) được ghi lại trong tổng thời gian 120 phút (khoảng thời gian này có thể được điều chỉnh). Tiến hành đo ở 60 phút sau khi bắt đầu quy trình.

3.1.2. Thử nghiệm sản xuất bánh mỳ, 4 công thức được thử nghiệm là:

- công thức PT1 chứa 15% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) sucroza và 0,4% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) canxi propionat;
- công thức PT2 chứa 18% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) sucroza và 0,4% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) canxi propionat;
- công thức PT3 chứa 23% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) sucroza và 0,4% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) canxi propionat;
- công thức PT4 chứa 25% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) sucroza và 0,4% trọng lượng (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) canxi propionat.

Trong các thử nghiệm 1 đến 4, hiệu số về thời gian kiểm chứng giữa nấm men khô thu được với chủng cần đánh giá và nấm men khô thu được với chủng đối chứng “C” được đo trong quy trình làm bánh mỳ nhất định và với các công thức nhất định. Hiệu quả được đo dưới dạng phần trăm hiệu số giữa chủng được thử nghiệm và chủng đối chứng. Hiệu số âm tương ứng với hiệu quả lớn hơn so với hiệu quả của chủng đối chứng.

Các công thức được sử dụng trong thử nghiệm và thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm của thành phần khác so với bột được nêu trong bảng sau. Bảng này cũng bao gồm chi tiết về các quy trình khác nhau được sử dụng.

THỬ NGHIỆM	No Time 15%+ No Time 18%+ Rotimani 23%+ No Time 25%+			
	PT1	PT2	PT3	PT4
THÀNH PHẦN	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4
Bột	100%	100%	100%	100%
Nước	54%	52%	45%	50%
Sucroza	15%	18%	23%	25%
Muối	1,7%	1%	1,5%	1,7%
Nấm men khô	1,5%	1%	2,3%	2%
Chất béo	7,5%	5%	10%	7,5%
Chất cải thiện	-	0,5%	0,3%	-
	1%	-	-	1%
Sữa bột	-	4%	3%	-
Trứng	-	6%	10%	-
Calpro	0,4%	0,4%	0,3%	0,4

NHIỆT ĐỘ	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4
Hệ thống + bột + nước	64°C	70°C	70°C	64°C

NHIỆT ĐỘ	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4
Hệ thống + bột + nước	64°C	70°C	70°C	64°C

Máy nhào Waterbath	22,5°C	23,5°C	24,5°C	22,5°C
Bột nhào	27°C	28°C	29°C	27°C

BIỂU ĐỒ	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3	Công thức 4
Nhào trộn Mac Duffy	L5 R5 H4	L1 +MG1 L1 H4	L1 +MG1 L1 H5,5	L5 R5 H4
Lên men khối	10 phút	15 phút	10 phút	10 phút
Phân chia	320 g	320 g	320 g	320 g
Làm tròn – kéo dài				
Thời gian từ kết thúc nhào trộn đến bắt đầu tạo hình	25 phút	50 phút	25 phút	25 phút
Máy tạo hình Tạo hình US				
Kiểm chứng Lò Forma	35°C, độ ẩm tương đối 90%	35°C, độ ẩm tương đối 90%	35°C, độ ẩm tương đối 90%	35°C, độ ẩm tương đối 90%
Làm bánh Lò Reed	21 phút 190°C	21 phút 190°C	21 phút 190°C	21 phút 190°C

MÔ TẢ CHI TIẾT QUY TRÌNH:

Quy trình thử nghiệm áp dụng cho các công thức khác nhau nêu trên trong các thử nghiệm PT1 đến PT4 là như sau:

1. Cân các thành phần khác nhau.
2. Đo nhiệt độ xung quanh và nhiệt độ của bột.

3. Điều chỉnh nhiệt độ của nước để đạt tới nhiệt độ của bột nhào, ở $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 27°C đối với các công thức 1 và 4; 28°C đối với công thức 2 và 29°C đối với công thức 3.
4. Cho các thành phần vào bát Mac Duffy® của máy nhào Hobart A200®, vỏ máy được điều nhiệt trước bằng nước ở $22,5^{\circ}\text{C}$ (các công thức 1 và 4) hoặc $23,5^{\circ}\text{C}$ (công thức 2) hoặc $24,5^{\circ}\text{C}$ (công thức 3).
5. Trộn các thành phần khô ở tốc độ đầu tiên trong 1 phút.
6. Biểu đồ nhào phụ thuộc vào công thức được sử dụng:
 - các công thức 1 và 4:
 - đưa chất béo vào sau khi trộn khô sơ bộ
 - rót nước vào
 - trộn trong 5 phút ở tốc độ đầu tiên (L5)
 - để yên sản phẩm thu được trong 5 phút (R5)
 - nhào trong 4 phút ở tốc độ thứ hai (H4)
 - công thức 2:
 - rót nước vào sau khi trộn khô sơ bộ
 - trộn trong 1 phút ở tốc độ đầu tiên (L1)
 - để yên sản phẩm thu được trong 1 phút để thêm chất béo (+MG1)
 - trộn trong 1 phút ở tốc độ đầu tiên (L1)
 - nhào trong 4 phút ở tốc độ thứ hai (H4)
 - công thức 3:
 - rót nước vào sau khi trộn khô sơ bộ
 - trộn trong 1 phút ở tốc độ đầu tiên (L1)
 - để yên sản phẩm thu được trong 1 phút để thêm chất béo (+MG1)
 - trộn trong 1 phút ở tốc độ đầu tiên (L1)
 - nhào trong 5 phút 30 giây, ở tốc độ thứ hai (H5.5).
7. Thay đổi nhiệt độ của bột nhào thu được ở cuối bước nhào.
8. Lên men khối ở 23°C trong 10 phút (các công thức 1, 3 và 4) hoặc 15 phút (công thức 2)
9. Chia thành các mảnh 320g.
10. Làm thành vòng xốp và đập lại.
11. Để yên trong 10 phút (các công thức 1, 3 và 4) hoặc 30 phút (công thức 2).

12. Tạo hình bột nhào.
13. Đặt các mảnh bột nhào 320g vào chảo (các kích thước: đáy chảo 185 x 75mm; đỉnh chảo 200 x 90mm; chiều cao chảo 75mm).
14. Xác định thời gian kiểm chứng, trong thiết bị ủ Stéricult® ở 35°C và độ ẩm tương đối 90%. Thời gian kiểm chứng là thời gian trôi qua từ lúc đặt chảo vào thiết bị ủ đến khi bột nhào đạt tới chiều cao 85mm trong chảo.
15. Nướng bánh trong lò khay Reed® trong 21 phút ở 190°C.

Ví dụ 3.2: Kết quả

Bảng 1: Thử nghiệm với bình đo men: khác biệt giữa chủng lai theo sáng chế và chủng gốc I-4341

Sinh khối sản xuất được trong bình, đánh giá nấm men tươi

Thử nghiệm	Chủng gốc 1 I-4341 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	Chủng gốc 2 I-4448 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	I-4312 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	I-4313 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>
A5	122	120	137	132
A5'	92	98	114	115
Mức tăng/chủng gốc			17 & 24%	18 & 24%

Bảng 2: Thử nghiệm sơ đồ No-Time Dough, chủng lai theo sáng chế so với nấm men thu được từ chủng không được thích ứng lưu giữ ngày 8-7-2010 tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp) với số hiệu lưu giữ I-4342.

Sinh khối sản xuất được trong bình lên men 20L, đánh giá nấm men khô

Thử nghiệm	I-4342 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	I-4313 <u>Không được</u> <u>thích ứng</u>
PT1	T	-14%
PT2	T	-9%

PT3	T	-17%
-----	---	------

Bảng 3: Sơ đồ No-Time Dough, chủng lai theo sáng chế so với chủng đối chứng được thích ứng (= I-4341 được thích ứng)

Sinh khối sản xuất được trong bình lên men 20L, đánh giá nấm men khô

Thử nghiệm	I-4341	I-4313
	<u>Được thích ứng</u>	<u>Không được thích ứng</u>
PT2	T	1%
PT3	T	-5%
PT4	T	3%

Kết luận: Nấm men không được thích ứng theo sáng chế có tập tính hầu như bằng hoặc thậm chí tốt hơn so với nấm men đối chứng được thích ứng, được tạo ra bằng cách lai một trong số các chủng chịu được áp suất thẩm thấu tốt nhất khả dụng trong bộ sưu tập nội bộ của người nộp đơn và được lưu giữ với số hiệu lưu giữ I-4341 và chủng thương mại không mất cảm nhiều với axit yếu.

Các kết quả này là bất ngờ do hoàn toàn không dự đoán được là có thể cộng gộp các ưu điểm hiện có của hai chủng gốc bằng cách lai các chủng công nghiệp, đặc biệt là khi vượt quá 15% đến 25% trị số giải phóng khí của hai chủng gốc của chúng.

Do đó, sáng chế đề xuất chủng lai có khả năng sản xuất nấm men bánh mì với chi phí thấp hơn mà vẫn hữu hiệu trong bột nhào bánh mì có độ ngọt cao và với sự có mặt của chất ức chế mốc như canxi propionat.

Ví dụ 4: Điều chế các chủng đột biến I-4409 và I-4410

Chủng I-4341 được gây đột biến bằng cách cho tiếp xúc với tia cực tím. Quần thể đột biến được đánh giá bằng các thử nghiệm A5 và A5' sau khi sản xuất trong bình. Các chủng I-4409 và I-4410 trước hết được chọn từ quần thể này.

Ví dụ 5: Điều chế nấm men từ các chủng đột biến thu được ở ví dụ 4 (cũng từ ví dụ 2)

Ví dụ 6: So sánh hiệu quả với nấm men đối chứng

Sinh khối sản xuất được trong bình, đánh giá nấm men tươi

	I-4341	I-4409	I-4410
Thử nghiệm	<u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	<u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	<u>Không được</u> <u>thích ứng</u>
A5	121	117	126
A5"	88	105	96
Mức tăng/I-4341 bằng A5" (%)		19	9

Sinh khối sản xuất được trong bình lên men 20L, đánh giá nấm men khô

	I-4341	I-4409	
Thử nghiệm	<u>Được thích</u> <u>ứng</u>	<u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	Hiệu số (%)
A5	101	101	0
A5'	104	100	-4
A51	104	114	10
A51'	136	159	17

	I-4341	I-4410	
Thử nghiệm	<u>Được thích</u> <u>ứng</u>	<u>Không được</u> <u>thích ứng</u>	Hiệu số (%)
A5	96	106	10
A5'	101	97	-4

Kết quả làm bánh mỳ thu được với các nấm men này là như sau (các thử nghiệm PT2 và PT3)

	I-4341	I-4410	I-4410
Thử nghiệm	<u>Được thích ứng</u>	<u>Không được thích ứng</u>	<u>Được thích ứng</u>

PT2	T	2%	-11%
PT3	T	2%	-4%

Thử nghiệm	I-4341	I-4409
	<u>Được thích ứng</u>	<u>Không được thích ứng</u>
PT1	T	3%
PT2	T	5%
PT3	T	-1%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* có thể thu được:

- bằng phương pháp lai bao gồm việc lai chủng *Saccharomyces cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia Pháp (CNCM) với số hiệu lưu giữ I-4341 với chủng được lưu giữ ngày 09 ngày 02 năm 2011 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4448 và ít nhất một bước chọn chủng lai thu được, được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) hoạt tính lên men, đo được bằng cách sử dụng thiết bị đo men Burrows và Harrison trong thử nghiệm A5' hoặc trong các thử nghiệm A5 và A5', chủng lai được chọn sao cho mức giải phóng khí của nó lớn hơn ít nhất là 10%, và tốt hơn là từ 15% đến 25%, so với mức giải phóng khí của chủng đối chứng chứa chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4341;

(ii) thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 15%, 18%, 23% hoặc 25% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột - baker's percentage) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, các chủng lai được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mì bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, với thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 85% đến 105% và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng được thể hiện bởi nấm men bánh mì đối chứng được tạo ra từ chủng *Saccharomyces cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản có thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên,

hoặc

- bằng phương pháp đột biến ngẫu nhiên chủng *Saccharomyces cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4341, và ít nhất một bước chọn chủng đột biến thu được, được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) hoạt tính lên men, đo được bằng cách sử dụng thiết bị đo men Burrows và Harrison trong thử nghiệm A5”, chủng đột biến được chọn sao cho mức giải phóng khí của nó lớn hơn từ 5% đến 20%, so với mức giải phóng khí của chủng đối chứng chứa chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4341,
- (ii) thời gian kiểm chứng trong sơ đồ No-Time Dough đối với bột nhào chứa 15%, 18%, 23% hoặc 25% đường (tỷ lệ phần trăm của thành phần này so với bột) với sự có mặt của 0,4% canxi propionat, chủng đột biến được chọn có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ bằng cách sinh sản, khi không có sự thích ứng với canxi propionat, có thời gian kiểm chứng nằm trong khoảng từ 95% đến 105% thời gian kiểm chứng được thể hiện bởi nấm men bánh mỳ đối chứng được tạo ra từ chủng *Saccharomyces cerevisiae* công nghiệp được lưu giữ ngày 08 tháng 07 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4341 bằng cách sinh sản có thích ứng với sự có mặt của canxi propionat của chủng nêu trên,

khác biệt ở chỗ, chủng *Saccharomyces cerevisiae* này có khả năng sản xuất nấm men bánh mỳ, bằng cách sinh sản mà không có sự thích ứng với sự có mặt của (các) axit yếu, có khả năng chịu được áp suất thẩm thấu và có tính kháng nội đối với các axit hữu cơ yếu.

2. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo điểm 1, chủng này được lưu giữ ngày 11 tháng 05 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4312.
3. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo điểm 1, chủng này được lưu giữ ngày 11 tháng 05 năm 2010 tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4313.
4. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo điểm 1, chủng này được lưu giữ tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4409.
5. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo điểm 1, chủng này được lưu giữ tại CNCM với số hiệu lưu giữ I-4410.
6. Nấm men bánh mỳ có thể thu được bằng cách sinh sản, mà không thích ứng với sự có mặt của (các) axit yếu, chủng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, hoặc thu được bằng phương pháp được xác định theo điểm 1.
7. Bột nhào bánh mỳ chứa nấm men bánh mỳ theo điểm 6.

8. Bột nhào bánh mỳ theo điểm 7, đặc trưng ở chỗ, bột nhào này được chọn từ các bột nhào mà trong đó quá trình lên men được thực hiện cả với sự có mặt của áp suất thẩm thấu do sự có mặt của ít nhất 15% đường, tốt hơn là ít nhất 18% đường và tốt hơn nữa là ít nhất 23% đường lẫn với sự có mặt của chất ức chế mốc thuộc loại axit hữu cơ yếu, tốt hơn là ở dạng canxi propionat, các phần trăm được biểu thị là tỷ lệ phần trăm của thành phần khác so với bột.

9. Phương pháp sản xuất sản phẩm bánh mỳ bằng cách sử dụng bột nhào bánh mỳ theo điểm 7 hoặc điểm 8.

10. Sản phẩm bánh mỳ có thể thu được bằng phương pháp theo điểm 9.