



(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)



1-0023900

(51)⁷ C12R 1/865; C12P 1/02; C12P 7/06

(13) B

(21) 1-2014-04427

(22) 24/05/2013

(86) PCT/FR2013/051137 24/05/2013

(87) WO2013/178915 05/12/2013

(30) 1255076 01/06/2012 FR

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/05/2015 326A

(73) LESAFFRE ET COMPAGNIE (FR)

41 rue Etienne Marcel, F-75001 Paris, France

(72) DESFOUGERES, Thomas (FR); PIGNEDE, Georges (FR)

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

(54) CHUNG NẤM MEN CÓ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA XYLOZA VÀ CHỐNG
CHỊU AXIT AXETIC, PHƯƠNG PHÁP THU ĐƯỢC CHỦNG NÀY VÀ PHƯƠNG
PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM LÊN MEN

(57) Sáng chế liên quan đến chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống
chịu axit và phương pháp thu được chủng này. Phương pháp theo sáng chế bao gồm các
bước:

- lai chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm
men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể lai,

- chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến các chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và đồng thời có khả năng chống chịu ít nhất một chất ức chế lên men. Sáng chế cũng liên quan đến phương pháp thu được các chủng này, nấm men thu được từ các chủng nấm men này và phương pháp sản xuất sản phẩm lên men sử dụng nấm men nêu trên trong môi trường chứa xyloza, tùy ý với sự có mặt của ít nhất một chất ức chế lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2011/071616 mô tả các nấm men dùng để sản xuất rượu trong môi trường chứa ít nhất một pentoza, thông qua sự biểu hiện con đường chuyển hoá XI-XDH (xyloza isomeraza- xylitol dehydrogenaza). Tài liệu này lần đầu tiên mô tả sự kết hợp của biểu hiện quá mức hoạt tính của xyloza isomeraza (XI) với sự biểu hiện quá mức hoạt tính của xylitol dehydrogenaza (XDH) và cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức hoạt tính của xylitol dehydrogenaza khiến cho nó có thể ngăn ngừa sự ức chế hoạt tính của xyloza isomeraza bởi xylitol. Ví dụ, đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2011/071616 mô tả chủng nấm men được lưu giữ ở Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (National Collection of Microorganism Cultures - CNCM) ngày 05 tháng 10 năm 2011, dưới số hiệu lưu giữ I-4538.

Việc sản xuất rượu công nghiệp nhờ nấm men từ các sản phẩm thủy phân lignoxenluloza cần đến không chỉ bộ máy di truyền để chuyển hoá pentoza, mà còn cần các đặc tính chống chịu các chất ức chế lên men có mặt trong các chất thủy phân lignoxenluloza này.

Các chất ức chế lên men được tạo ra trong khi xử lý sơ bộ và thủy phân sinh khối lignoxenluloza. Các chất ức chế trong số các chất ức chế này là furaldehyt

(furfural, HMF), các hợp chất phenol và các axit hữu cơ (axit axetic, axit levulinic, axit formic).

Các biện pháp khác nhau đã được mô tả để chống lại tác động của các chất ức chế lên men, trong số các biện pháp đó là khử độc môi trường lên men, cải thiện quá trình lên men, hoặc cải thiện sự chống chịu chất ức chế lên men của nấm men.

Ví dụ, tính chống chịu chất ức chế lên men của nấm men được cải thiện bằng công nghệ di truyền, bằng cách tiến hoá trực tiếp hoặc bằng cách thích nghi (Almeida and Hahn-Hägerdal, International Sugar Journal, 2009, Vol. 111, No. 1323).

Tuy nhiên, dường như khó tạo ra được chủng nấm men công nghiệp sinh ra nấm men vừa hữu hiệu để sản xuất rượu trong môi trường lên men chứa ít nhất một pentoza, và vừa chống chịu ít nhất một chất ức chế lên men.

Do vậy, có nhu cầu thực sự để tạo ra các chủng nấm men mới có khả năng chuyển hoá ít nhất một pentoza, ví dụ, xyloza, thậm chí với sự có mặt của ít nhất một chất ức chế lên men, như axit axetic, các chủng nấm men này sinh ra nấm men hữu hiệu để sản xuất rượu, thậm chí với sự có mặt của ít nhất một chất ức chế lên men.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích thứ nhất theo sáng chế là đề xuất chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia) dưới số hiệu lưu giữ I-4627.

Mục đích thứ hai theo sáng chế là đề xuất phương pháp thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, phương pháp này bao gồm các bước:

- lai chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia) dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể lai,

- chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Mục đích thứ ba của sáng chế là đề xuất chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, mà có thể thu được nhờ phương pháp như được xác định trên đây.

Mục đích thứ tư của sáng chế là đề xuất chủng nấm men thu được từ chủng nấm men như được xác định trên đây, khác biệt ở chỗ, chủng nấm men thu được này có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Mục đích thứ năm của sáng chế là đề xuất nấm men thu được bằng cách nuôi cấy chủng nấm men nêu trên hoặc bằng cách nuôi cấy chủng nấm men thu được như được xác định trên đây.

Mục đích thứ sáu của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, phương pháp này bao gồm bước lên men, trong điều kiện kỵ khí, bằng cách sử dụng nấm men như nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện lượng etanol được tạo ra (g/kg môi trường lên men) theo thời gian (giờ) trong môi trường lên men YFGX-Ac, ở 32°C, nhờ chủng nấm men I-4538 (hình thoi), chủng nấm men H1 (hình vuông), chủng nấm men ED1 (hình tam giác), chủng nấm men ED2 (hình tròn) và chủng nấm men ED3 (hình chữ thập).

Fig.2 là hình vẽ thể hiện lượng etanol được tạo ra (g/kg môi trường lên men) theo thời gian (giờ) trong môi trường A, ở 32°C, nhờ chủng nấm men I-4538 (hình thoi), chủng nấm men ED1 (hình tam giác) và chủng nấm men ED2 (hình tròn).

Fig.3 là hình vẽ thể hiện lượng etanol được tạo ra (g/kg môi trường lên men) theo thời gian (giờ) trong môi trường A, ở 35°C, nhờ chủng nấm men I-4538 (hình thoi), chủng nấm men ED1 (hình tam giác), chủng nấm men ED2 (hình tròn) và chủng nấm men ED3 (hình chữ thập).

Fig.4 là hình vẽ thể hiện lượng etanol được tạo ra (g/kg môi trường lên men) theo thời gian (giờ) trong môi trường B, ở 35°C, nhờ chủng nấm men I-4538 (hình thoi), chủng nấm men ED1 (hình tam giác), chủng nấm men ED2 (hình tròn) và chủng nấm men ED3 (hình chữ thập).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Thuật ngữ “chủng nấm men” dùng để chỉ quần thể tế bào nấm men tương đối đồng nhất.

Chủng nấm men thu được bằng cách phân lập một dòng, dòng này là quần thể tế bào thu được từ một tế bào nấm men.

Thuật ngữ gen “ngoại sinh” được dự định có nghĩa là gen không có mặt trong tự nhiên trong chủng nấm men của các loài đang được xem xét.

Thuật ngữ gen “nội sinh” được dự định có nghĩa là gen có mặt trong tự nhiên trong chủng nấm men của các loài đang được xem xét.

Xyloza isomeraza hoặc XI (xylose isomerase) ở đây dùng để chỉ enzym có khả năng chuyển hoá D-xyloza thành D-xyluloza ở một bước, và enzym này tương ứng với lớp EC 5.3.1.5.

Xylitol dehydrogenaza hoặc XDH (xylitol dehydrogenase) ở đây dùng để chỉ enzym có khả năng chuyển hoá xylitol thành D-xyluloza ở một bước, và enzym này tương ứng với lớp EC 1.1.1.9.

Xyloza reductaza hoặc XR (xylose reductase) ở đây dùng để chỉ enzym có khả năng chuyển hoá D-xyloza thành xylitol ở một bước, và enzym này tương ứng với lớp EC 1.1.1.307.

D-xylulokinaza (D-xylulokinase) hoặc XKS ở đây dùng để chỉ enzym có khả năng chuyển hoá D-xyluloza thành D-xyluloza-5-phosphat ở một bước, và enzym này tương ứng với lớp EC 2.7.1.17.

Gen GRE3 mã hoá enzym aldoza reductaza mà tương ứng với loại EC 1.1.1.21.

Gen RPE1 mã hoá enzym D-ribuloza-5-phosphat 3-epimeraza mà tương ứng với lớp EC 5.1.3.1.

Gen RKI1 mã hoá enzym riboza-5-phosphat ketol-isomeraza mà tương ứng với lớp EC 5.3.1.6.

Gen TKL1 mã hoá enzym transketolaza mà tương ứng với lớp EC 2.2.1.1.

Gen TAL1 mã hoá enzym transaldolaza mà tương ứng với lớp EC 2.2.1.2.

Chủng nấm men nguyên dưỡng là chủng nấm men có khả năng phát triển trong môi trường tối thiểu. Cụ thể, chủng nấm men nguyên dưỡng theo sáng chế có khả năng tổng hợp tất cả các axit amin và bazơ cần thiết cho sự sinh trưởng của nó.

Môi trường tối thiểu là môi trường chứa nguồn cacbon ($C_xH_yO_z$), nguồn nitơ vô cơ, nguồn kali, nguồn phospho, nguồn lưu huỳnh, nguồn magiê, nguồn canxi, nguồn sắt, nguồn các nguyên tố vi lượng và nước.

Ví dụ về môi trường tối thiểu là môi trường YNB (Yeast Nitrogen Base- nấm men nitơ bazơ) có nguồn cacbon (ví dụ, đường) và nguồn nitơ vô cơ (ví dụ, amoni sulfat) được bổ sung vào.

Trong mỗi lít môi trường YNB chứa: 2 µg biotin, 400 µg canxi pantothenat, 2 µg axit folic, 2000 µg inositol, 400 µg niacin, 200 µg axit p-aminobenzoic, 400 µg pyridoxin hydroclorua, 200 µg riboflavin, 400 µg thiamin hydroclorua, 500 µg axit boric, 40 µg đồng sulfat, 100 µg kali iodua, 200 µg sắt (III) clorua, 400 µg mangan sulfat, 200 µg natri molybdenat, 400 µg kẽm sulfat, 1 g kali phosphat monobazơ, 500 mg magie sulfat, 100 mg natri clorua, 100 mg canxi clorua, 5 g/l nhôm sulfat, độ pH cuối cùng là 5,4.

Cụm từ “chủng nấm men thu được” dùng để chỉ chủng nấm men thu được bởi một hoặc nhiều bước lai và/hoặc bằng cách đột biến và/hoặc bằng cách biến nạp gen.

Chủng nấm men thu được bằng cách lai có thể thu được bằng cách lai chủng nấm men theo sáng chế với chủng nấm men tương tự, với một chủng nấm men khác theo sáng chế, hoặc với chủng nấm men khác bất kỳ.

Chủng nấm men thu được bằng cách đột biến có thể là chủng nấm men có ít nhất một đột biến tự phát trong bộ gen của nó hoặc ít nhất một đột biến gây ra bởi sự đột biến gen. (Các) đột biến của chủng thu được có thể là hoặc có thể không là câm.

Cụm từ “đột biến gen” dùng để chỉ cả đột biến ngẫu nhiên thu được bằng cách ứng dụng chiếu xạ (ví dụ, chiếu xạ tia cực tím) hoặc bằng cách sử dụng hoá

chất gây đột biến, và cả đột biến bằng cách ghép hoặc đột biến thay đổi, bằng cách đổi vị trí hoặc bằng cách hợp nhất một mảnh ADN ngoại sinh.

Chủng nấm men thu được bằng cách biến đổi gen là chủng nấm men có trình tự ADN được đưa vào, tốt hơn nếu trình tự ADN này được tạo ra bởi plasmid hoặc được hợp nhất một cách trực tiếp vào bộ gen.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng nấm men có khả năng chuyển hoá ít nhất một pentoza, cụ thể là xyloza, ngay cả với sự có mặt của ít nhất một chất ức chế lên men, như axit axetic.

Đối với mục đích của sáng chế, chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza là chủng nấm men có khả năng tạo ra etanol trong môi trường chứa xyloza, dưới điều kiện kỵ khí.

Cụ thể, chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza là chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza thành etanol, tức là có khả năng lên men xyloza.

Sự chuyển hoá của xyloza thành etanol là kết quả của sự đồng phân hoá trực tiếp hoặc gián tiếp xyloza thành xyluloza, tiếp theo là sử dụng xyluloza thu được trong phần không oxy hoá của quá trình tạo pentoza phosphat.

Đối với mục đích của sáng chế, chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza là chủng nấm men chuyển hoá được ít nhất là 70%, tốt hơn là ít nhất là 80%, tốt hơn nữa là ít nhất là 90% xyloza thành etanol trong 60 giờ trong môi trường chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg môi trường lên men, dưới điều kiện kỵ khí.

Tốt hơn, nếu việc cấy chủng nấm men được dùng để đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol là 0,25 g chất khô/kg của môi trường lên men.

Thời gian 60 giờ được tính bắt đầu từ việc cấy chủng nấm men vào môi trường lên men.

Tốt hơn, nếu môi trường lên men dùng để đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol là môi trường tổng hợp.

Môi trường tổng hợp là môi trường có thành phần hoá học chính xác đã biết.

Môi trường tổng hợp theo sáng chế chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, và cả các vitamin và khoáng chất chủ yếu cho sự sinh trưởng của chủng nấm men.

Theo một phương án được ưu tiên, môi trường lên men dùng để đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol là môi trường tổng hợp YFGX chứa 55 g/kg glucoza, 45 g/kg xyloza, 10 g/kg dịch chiết nấm men, 10 g/kg peton và 2000 phần triệu axit axetic, độ pH được điều chỉnh đến 5 bằng KOH.

Trong môi trường YFGX, axit axetic có mặt với nồng độ 2000 phần triệu ở độ pH=5 mà không có tác dụng ức chế.

Tốt hơn, nếu sự lên men được thực hiện ở nhiệt độ 32°C, bằng cách khuấy vừa phải, ví dụ, 90 vòng/phút.

Việc khuấy vừa phải để không bị oxy hoá.

Tốt hơn, nếu độ pH của môi trường được kiểm soát, bằng dung tích đệm gồm cặp axit/bazơ chẳng hạn, ví dụ, dung tích đệm chứa axit axetic/axetat trong môi trường YFGX.

Lượng etanol có mặt trong môi trường lên men được đo bằng phương tiện thích hợp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Có thể tiến hành việc đo trực tiếp lượng etanol đã được tạo ra hoặc đo gián tiếp qua thông số liên quan tới việc tạo ra etanol, như khối lượng hao hụt.

Ví dụ, lượng rượu được tạo ra có thể đo được nhờ phép sắc ký, cụ thể là HPLC (Sắc ký lỏng hiệu năng cao - High Performance Liquid Chromatography), kit enzym (ví dụ, kit phân tích etanol của Boehringer), hoặc phân tích bằng cách sử dụng kali dicromat.

Lượng xyloza có mặt trong môi trường lên men đo được bằng phương tiện thích hợp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, tốt hơn là bằng phép sắc ký, cụ thể là HPLC.

Việc sử dụng môi trường lên men chứa cả glucoza và xyloza khiến cho có thể đánh giá sự chuyển hoá của xyloza thành etanol bằng cách sử dụng lượng sinh khối có thể so sánh được đối với các chủng nấm men khác nhau được đánh giá.

Thực vậy, chủng nấm men này trước tiên lên men glucoza của hỗn hợp glucoza và xyloza, và sau đó lên men glucoza và xyloza.

Khả năng chuyển hoá xyloza với sự có mặt của ít nhất một chất ức chế lên men được mô tả dưới dạng tính chống chịu chất ức chế lên men nêu trên.

Trong phạm vi của sáng chế, tốt hơn nếu chất ức chế lên men là axit axetic. Axit axetic ở dạng không ion hoá, bắt đầu từ nồng độ nhất định, có tên là nồng độ độc hại, là nguyên nhân sinh ra độc tố và do đó gây ra tác dụng ức chế của nó.

Ví dụ, nồng độ axit axetic là 4000 phần triệu ở độ pH=4,4 là nồng độ độc hại đối với các chủng không chống chịu axit axetic, như chủng nấm men I-4538.

Trong khi sự lên men xảy ra dưới điều kiện kỵ khí, thì tác dụng ức chế dẫn đến kết quả cụ thể là làm chậm sự bắt đầu chuyển hoá đường thành sinh khối và thành etanol.

Sự chống chịu axit axetic đo được ở đây đối với thời gian làm chậm sự bắt đầu chuyển hoá của đường thành etanol, tức là đối với thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu.

Đường cong lên men của rượu thể hiện lượng rượu được tạo ra nói chung dưới dạng hàm số của thời gian bao gồm ba giai đoạn:

- giai đoạn tiềm ẩn, trong đó không tạo ra etanol,
- giai đoạn tạo ra rượu, và
- giai đoạn bình ổn, tương ứng với việc kết thúc sự lên men.

Thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ở đây tương ứng với trục x ở vị trí ban đầu của đường biểu thị đạo hàm cực đại của tốc độ tạo ra rượu.

Một cách đơn giản hơn, thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ở đây tương ứng với trục x ở vị trí bắt đầu của đường tương ứng với độ nghiêng của giai đoạn tạo ra rượu.

Chủng nấm men chống chịu axit axetic được xác định ở đây là chủng nấm men có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu nhỏ hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4.

Tốt hơn, nếu môi trường lên men được dùng để đánh giá tính chống chịu axit axetic là môi trường tổng hợp, tốt hơn nữa là môi trường YFAc.

Thành phần của môi trường YFAc là như sau: 150 g/kg glucoza, 5 g/kg dịch chiết từ nấm men, 4,7 g/kg DAP (điamoni phosphat), 11,5 g/kg axit xitric, 4 g/kg axit axetic, 13,5 g/kg natri xitrat, 1 ml/kg Tween 80, 2 ml/kg ZnSO_4 (ở nồng độ 10,6 g/l), 2,5 ml/kg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ở nồng độ 400 g/l), 1 ml/kg thiamin (ở nồng độ 18,24 g/l), 1 ml/kg pyridoxin (ở nồng độ 5,28 g/l), 1 ml/kg biotin (ở nồng độ 1,76 g/l), 1 ml/kg pantothenat (ở nồng độ 3,8 g/l), 2,5 ml/kg axit nicotinic (ở nồng độ 8 g/l), 1 ml/kg mesoinositol (ở nồng độ 50 g/l), 1 ml/kg riboflavin (ở nồng độ 1 g/l), 1 ml/kg para-aminobenzoat (ở nồng độ 1,2 g/l), độ pH được điều chỉnh tới 4,4 bằng KOH.

Tốt hơn, nếu việc cấy bằng chủng nấm men được dùng để đánh giá tính chống chịu axit là 0,25 g chất khô/kg môi trường lên men.

Thời gian $t = 0$ của đường cong lên men rượu tương ứng với thời gian mà chủng nấm men được cấy vào môi trường lên men.

Tốt hơn, nếu sự lên men rượu được tiến hành trong điều kiện kỵ khí, ở nhiệt độ 32°C và với việc khuấy vừa phải, ví dụ, 90 vòng/phút.

Việc khuấy vừa phải là để không bị oxy hoá.

Tốt hơn, nếu độ pH của môi trường được kiểm soát, bằng dung tích đệm chứa cặp axit/bazơ chẳng hạn, ví dụ, dung tích đệm chứa axit axetic/axetat trong môi trường YFAc.

Trong môi trường lên men YFAc, chủng nấm men không chống chịu axit axetic có thể có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ít nhất là 40 giờ.

Các tác giả sáng chế đã cố gắng để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza, ngay cả với sự có mặt của axit axetic, bắt đầu từ chủng nấm men hữu hiệu theo chuyển hoá xyloza thành etanol.

Chủng nấm men này là hữu hiệu theo khái niệm chuyển hoá xyloza thành etanol, được chọn làm chủng gốc nhằm truyền cho nó đặc tính chịu axit axetic, là chủng nấm men I-4538 được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 05 tháng 10 năm 2011, tại CNCM (Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia - National Collection

of Microorganism Cultures), 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Pháp.

Chủng nấm men I-4538 chuyển hoá ít nhất 90% xyloza thành etanol trong 60 giờ trong môi trường lên men YFGX chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg môi trường này.

Tuy nhiên, chủng nấm men I-4538 đặc biệt nhạy với axit axetic; nó có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ít nhất là 40 giờ trong môi trường lên men YFAC chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4.

Chủng nấm men I-4538 là chủng *Saccharomyces cerevisiae* thu được bằng cách tiến hoá trực tiếp từ chủng nấm men được biến đổi gen bằng cách:

- chèn ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xyloza isomerase (XI) của chủng *Clostridium phytofermentans*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1,
- chèn ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xylitol dehydrogenase (XDH) của chủng *Pichia stipitis*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1,
- ít nhất một bản sao của gen nội sinh TAL1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pPGK1,
- ít nhất một bản sao của gen nội sinh TKL1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
- ít nhất một bản sao của gen nội sinh RPE1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
- ít nhất một bản sao của gen nội sinh RKI1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
- chèn ít nhất một bản sao gen nội sinh mã hoá xylulokinase (XKS1), dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1, và
- làm mất đoạn ít nhất một bản sao khung đọc mở của gen nội sinh GRE3 mã hoá aldoza reductase.

Chủng nấm men I-4538 không có bất kỳ gen đánh dấu chọn lọc sót nào cả.

Chủng nấm men I-4538 không chứa gen mã hoá gen ngoại sinh gốc XR, hoặc gen araA, araB hoặc gen AraD.

Gen ngoại sinh mã hoá xyloza isomeraza (XI) của chủng *Clostridium phytofermentans* là gen của trình tự được tối ưu hoá được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 được mô tả trong DE102008031350.

Gen ngoại sinh mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) của chủng *Pichia stipitis* là gen của trình tự tham chiếu X55392.1 trong ngân hàng Gen.

Các gen khởi đầu pADH1, pPGK1 và pTDH3 là gen khởi đầu của chủng *Saccharomyces cerevisiae*.

Gen kết thúc CYC1 là gen khởi đầu của chủng *Saccharomyces cerevisiae*.

Chủng nấm men I-4538 là chủng nấm men công nghiệp thể bội không chỉnh.

Chủng nấm men I-4538 là chủng nấm men thể nguyên dưỡng.

Để tạo ra đặc tính chống chịu axit axetic cho chủng nấm men I-4538, nhưng hầu như không làm cải biến khả năng chuyển hoá xyloza của nó, các tác giả sáng chế đã chọn việc sử dụng kỹ thuật lai chủng.

Theo sự hiểu biết của các tác giả sáng chế, đây là lần đầu tiên kỹ thuật lai được sử dụng để cải thiện chủng nấm men thể bội không chỉnh được biến đổi gen.

Thực vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này không thể thoát nhìn mà có thể sử dụng kỹ thuật lai, khi chủng nấm men gốc:

- chứa không ít hơn tám cải biến di truyền mà trước hết phải được chuyển vào thể phân ly đã được chọn,
- là chủng nấm men thể bội không chỉnh và có các vấn đề về sự phân ly khi không có mặt tính lưỡng bội nghiêm ngặt, và
- đã trải qua bước đột biến trong phạm vi tiến hoá trực tiếp, có thể là nguyên nhân gây khó khăn cho việc lai, cụ thể là trong trường hợp chuyển đoạn nhiễm sắc thể do vấn đề nảy mầm gây ra.

Việc lai như vậy được tiến hành giữa chủng nấm men I-4538 và các chủng nấm men chống chịu axit axetic và không bị biến đổi gen, tức là không có bộ máy di truyền cần thiết đối với sự lên men xyloza.

Các chủng nấm men chống chịu axit axetic, được dùng cho việc lai, có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 14 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Các kết quả lai là không thuyết phục: trong khi đặc tính chịu axit axetic được chuyển thực sự cho các thể lai, thì các thể lai lại không hữu hiệu so với chủng nấm men gốc I-4538 để chuyển hoá xyloza thành etanol.

Trong điều kiện tốt nhất, các thể lai thu được chuyển hoá 40% xyloza thành etanol trong 60 giờ trong môi trường lên men YFGX chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg môi trường này.

Các tác giả sáng chế đã cố gắng để cải thiện khả năng lên men xyloza của các thể lai bằng cách tiến hoá trực tiếp, nhưng không có sự thành công thêm nữa.

Do đó, các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng, để chuyển đặc tính chịu axit axetic bằng cách lai, mà không làm mất khả năng chuyển hoá xyloza một cách hữu hiệu, thì điều cần thiết là lai chủng nấm men I-4538 với chủng nấm men chống chịu axit axetic có nền di truyền giống nhau, tức là cũng có bộ máy di truyền để chuyển hoá xyloza, nhưng không nhất thiết là hữu hiệu theo chuyển hoá xyloza.

Chủng nấm men được sử dụng vừa chống chịu axit axetic vừa có bộ máy di truyền để chuyển hoá xyloza, là chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ dưới số hiệu lưu giữ I-4627 theo Hiệp ước Budapest ngày 24 tháng 05 năm 2012, với CNCM (National Collection of Microorganism Cultures), 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Pháp.

Do vậy, bằng cách lai chủng nấm men I-4538 với chủng nấm men I-4627, các tác giả sáng chế đã thu được chủng nấm men hữu hiệu đối với cả việc chuyển hoá xyloza lẫn chống chịu axit axetic.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627.

Chủng I-4627 tạo ra một trong số hai chủng gốc để thu được các chủng nấm men theo sáng chế.

Chủng nấm men I-4627 là chủng nấm men mới, thu được bằng phương pháp ban đầu lai chủng nấm men thể bội không chỉnh chống chịu axit axetic và không bị biến đổi gen, với chủng nấm men thể bội không chỉnh được biến đổi gen.

Do vậy, chủng nấm men I-4627 thu được theo cách sau:

- chọn chủng nấm men chống chịu axit axetic, tức là chủng nấm men có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 14 giờ trong môi trường lên men YFAc,
- chọn chủng nấm men được biến đổi gen bằng cách:
 - chèn ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xyloza isomeraza (XI) chủng *Clostridium phytofermentans*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1,
 - chèn ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) chủng *Pichia stipitis*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1,
 - đặt ít nhất một bản sao gen nội sinh TAL1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pPGK1,
 - đặt ít nhất một bản sao gen nội sinh TKL1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
 - đặt ít nhất một bản sao gen nội sinh RPE1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
 - đặt ít nhất một bản sao gen nội sinh RKI1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3,
 - lồng ít nhất một bản sao gen nội sinh mã hoá xylulokinaza (XKS1) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1, và
 - làm mất đoạn ít nhất một bản sao khung đọc mở của gen nội sinh GRE3 mã hoá aldoza reductaza,
- lai chủng nấm men chống chịu axit axetic nêu trên với chủng nấm men bị biến đổi gen nêu trên, để thu được thể lai,

- tiến hoá trực tiếp thể lai nêu trên, để thu được chủng nấm men I-4627.

Chủng nấm men I-4627 chứa ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xyloza isomeraza (XI) của chủng *Clostridium phytofermentans*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1, ít nhất một bản sao gen ngoại sinh mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) của chủng *Pichia stipitis*, dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1, ít nhất một bản sao gen nội sinh TAL1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pPGK1, ít nhất một bản sao gen nội sinh TKL1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3, ít nhất một bản sao gen nội sinh RPE1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3, ít nhất một bản sao gen nội sinh RKI1 được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pTDH3, ít nhất một bản sao gen nội sinh mã hoá xylulokinaza (XKS1) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu pADH1 và gen kết thúc CYC1, và ít nhất một bản sao khung đọc mở của gen nội sinh GRE3 mã hoá aldoza reductaza đã bị làm mất đoạn.

Đối với chủng nấm men I-4538, gen ngoại sinh mã hoá xyloza isomeraza (XI) của chủng *Clostridium phytofermentans* là gen của trình tự được tối ưu hoá được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 được mô tả trong DE102008031350 và gen ngoại sinh mã hoá xylitol dehydrogenaza (XDH) của chủng *Pichia stipitis* là gen của trình tự tham chiếu X55392.1 trong ngân hàng Gen.

Chủng nấm men I-4627 không có bất kỳ gen đánh dấu chọn lọc sót nào cả.

Chủng nấm men I-4627 không chứa gen mã hoá XR có gốc ngoại sinh, hoặc gen araA, araB hoặc gen AraD.

Chủng nấm men I-4627 là chủng nấm men công nghiệp và là thể bội không chĩnh.

Chủng nấm men I-4627 là chủng nấm men thể nguyên dưỡng.

Tính chống chịu axit axetic của chủng nấm men I-4627 kém hơn so với chủng nấm men gốc chống chịu axit axetic dùng để lai, nhưng tính chống chịu axit axetic của nó lớn tới mức chấp nhận được để áp dụng trong công nghiệp.

Do vậy, chủng nấm men I-4627 có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 20 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Về tính hiệu quả đối với xyloza, chủng nấm men I-4627 chuyển hoá được gần 60% xyloza thành etanol, dưới điều kiện kỵ khí, trong 60 giờ, trong môi trường lên men YFGX chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường này.

Do vậy, chủng nấm men I-4627 là chủng nấm men gốc có tính chịu axit axetic và có bộ máy di truyền để chuyển hoá xyloza, nhưng không có khả năng chuyển hoá xyloza đối với các mục đích của sáng chế, tức là chủng nấm men này là không thích hợp đối với việc sử dụng ở quy mô công nghiệp để sản xuất etanol.

Do đó, các tác giả sáng chế đã lai chủng nấm men I-4538 với chủng nấm men I-4627, để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp thu chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, phương pháp này bao gồm các bước:

- lai chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể lai,
- chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Như đã được xác định trên đây, chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic theo sáng chế có các đặc tính sau:

- chuyển hoá được ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90% xyloza thành etanol trong 60 giờ trong môi trường lên men YFGX chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường lên men, dưới điều kiện kỵ khí, và
- có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, trong môi trường lên men YFAC chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4.

Bước lai được tiến hành theo các kỹ thuật thông thường, như kỹ thuật được trình bày trong chương 7, “Sporulation and Hybridization of Yeast” của R.R. Fowell, sách tham khảo “The Yeasts”, volume 1, edited by A.H. Rose and J. S. Harrison, 1969 - Academic Press.

Để cải thiện tính hiệu quả của phương pháp nhằm thu được chủng nấm men theo sáng chế, đặc biệt có lợi nếu chọn trong số các thể phân ly thu được từ chủng nấm men I-4538 và/hoặc trong số các thể phân ly thu được từ chủng nấm men I-4627.

Tốt hơn, nếu các thể phân ly của chủng nấm men I-4538 được sử dụng để lai được chọn dựa vào khả năng chuyển hoá xyloza của chúng.

Các thể phân ly của chủng nấm men I-4627 được sử dụng để lai được chọn dựa vào tính chống chịu axit axetic của chúng.

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây, khác biệt ở chỗ, bước lai bao gồm các việc sau:

- tạo thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538, để thu được ít nhất một thể phân ly X,
- tùy ý đánh giá sự chuyển hoá xyloza thành etanol bởi ít nhất một thể phân ly X,
- tạo thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể phân ly Y,
- tùy ý đánh giá tính chống chịu axit axetic của ít nhất một thể phân ly Y,
- lai ít nhất một thể phân ly X với ít nhất một thể phân ly Y, thể phân ly X này có khả năng chuyển hoá xyloza thành etanol và/hoặc thể phân ly Y nêu trên có tính chịu axit axetic, để thu được ít nhất một thể lai.

Các bước tạo thành bào tử, đánh giá sự chuyển hoá xyloza thành etanol và đánh giá tính chống chịu axit axetic có thể được thực hiện theo thứ tự mong muốn bất kỳ, miễn là sự tạo thành bào tử của chủng nấm men nhất định được thực hiện trước khi đánh giá các thể phân ly của nó.

Ví dụ, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây, khác biệt ở chỗ, bước lai nêu trên bao gồm các việc sau:

- hình thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538, để thu được ít nhất một thể phân ly X,
- tuỳ ý đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể phân ly X, dưới điều kiện kỵ khí, trong 60 giờ trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường nêu trên,
- tạo thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể phân ly Y,
- tuỳ ý đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của ít nhất một thể phân ly Y trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4,
- lai ít nhất một thể phân ly X với ít nhất một thể phân ly Y, thể phân ly X này chuyển hoá 60% xyloza thành etanol trong 60 giờ và/hoặc thể phân ly Y có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, để thu được ít nhất một thể lai.

Các bước tạo thành bào tử, đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol và đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu có thể được thực hiện theo thứ tự mong muốn bất kỳ, miễn là sự tạo thành bào tử của chủng nấm men nhất định được thực hiện trước khi đo thông số lựa chọn để áp dụng cho các thể phân ly của chủng này.

Tốt hơn, nếu việc cấy dùng để đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể phân ly của chủng nấm men I-4538 là 0,25 g chất khô/kg môi trường lên men.

Tốt hơn, nếu môi trường lên men được dùng để đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể phân ly của chủng nấm men I-4538 là môi trường lên men YFGX.

Các thể phân ly của chủng nấm men I-4538 trong tự nhiên kém hiệu quả hơn chủng gốc thể bội không chính theo chuyển hoá xyloza. Do vậy, việc chọn tiêu chuẩn để áp dụng đối với sự chuyển hoá xyloza thành etanol không đòi hỏi so với khả năng của chủng nấm men gốc I-4538.

Do đó, theo một phương án có lợi, thể phân ly của chủng nấm men I-4538 được chọn, trong điều kiện kỵ khí, nếu nó chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol trong 60 giờ trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường này, tốt hơn là ít nhất 65% xyloza, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70% xyloza.

Để tối ưu hoá khoảng thời gian của bước chọn thể phân ly, có thể đo mức độ chuyển hoá xyloza thành etanol bởi các thể phân ly của chủng nấm men I-4538 trong khoảng thời gian ngắn hơn, trong khoảng 48 giờ chẳng hạn.

Do đó, theo một phương án có lợi khác, thể phân ly của chủng nấm men I-4538 được chọn, trong điều kiện kỵ khí, nếu nó chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol trong 48 giờ trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường này, tốt hơn là ít nhất 65% xyloza, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70% xyloza.

Theo một phương án có lợi, thể phân ly của chủng nấm men I-4627 được chọn nếu nó có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4.

Tuy nhiên, điều ngạc nhiên là phần lớn các thể phân ly của chủng nấm men I-4627 chống chịu axit axetic tốt hơn chủng nấm men gốc I-4627, tức là thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của chúng ngắn hơn so với chủng nấm men gốc I-4627.

Do đó, tốt hơn nếu tiêu chuẩn lựa chọn áp dụng liên quan đến tính chống chịu axit axetic là khắt khe hơn.

Do vậy, theo một phương án đặc biệt có lợi, thể phân ly của chủng nấm men I-4627 được chọn nếu nó có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 25 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 20 giờ.

Tốt hơn, nếu môi trường lên men được sử dụng để đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của ít nhất một thể phân ly của chủng nấm men I-4627 là môi trường lên men YFAc.

Tốt hơn, nếu việc cấy được sử dụng để đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của ít nhất một thể phân ly của chủng nấm men I-4627 là 0,25 g chất khô/kg của môi trường lên men.

Các thể phân ly của chủng nấm men I-4627 có thể cũng được chọn theo khả năng chuyển hoá xyloza thành etanol của chúng.

Tuy nhiên, điều ngạc nhiên là các thể lai tốt nhất thu được bằng cách sử dụng các thể phân ly của chủng nấm men I-4627 chọn được chỉ dựa vào tính chống chịu axit axetic của chúng.

Tốt hơn, nếu bước lai được thực hiện với:

- ít nhất một thể phân ly X chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol, tốt hơn là ít nhất 65% xyloza, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70% xyloza trong 60 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ, và
- ít nhất một thể phân ly Y có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 25 giờ, thậm chí tốt hơn nữa là ngắn hơn 20 giờ.

Do đó, các thể lai thu được sau đó được chọn dựa trên hai tiêu chuẩn: khả năng chuyển hoá xyloza và tính chống chịu axit axetic của chúng.

Cụ thể hơn, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây, khác biệt ở chỗ, bước chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic nêu trên bao gồm các việc sau:

- đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể lai dưới điều kiện kỵ khí trong 60 giờ trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường lên men,
- đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của ít nhất một thể lai trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4,
- chọn ít nhất một thể lai chuyển hoá được ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90% xyloza thành etanol trong 60 giờ và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ,

để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Thứ tự của các bước đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol và đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu là không quan trọng; chúng có thể được tiến hành từ bước này đến bước kia, theo một chiều hoặc theo chiều ngược lại, hoặc trong cùng một thời gian.

Các điều kiện để đo phần trăm chuyển hoá của xyloza thành etanol và thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu là như được xác định trên đây.

Do đó, mục đích cụ thể của sáng chế là đề xuất phương pháp thu chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, phương pháp này bao gồm các bước:

- lai chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, bước lai này bao gồm các việc sau:
 - tạo thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538, để thu được ít nhất một thể phân ly X,
 - đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể phân ly X trong 60 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ, trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường này,
 - chọn ít nhất một thể phân ly X chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol trong 60 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ,
 - tạo thành bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể phân ly Y,
 - đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu bởi ít nhất một thể phân ly Y trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4,
 - chọn ít nhất một thể phân ly Y có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ,

- lai ít nhất một thể phân ly chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol trong 60 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ, với ít nhất một thể phân ly Y có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, để thu được ít nhất một thể lai,
- chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, bước chọn này bao gồm các việc sau:
 - o đo phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol bởi ít nhất một thể lai, dưới điều kiện kỵ khí, trong 60 giờ, trong môi trường lên men chứa 55 g glucoza và 45 g xyloza cho mỗi kg của môi trường lên men,
 - o đo thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu của ít nhất một thể lai trong môi trường lên men chứa 4000 phần triệu axit axetic ở độ pH=4,4,
 - o chọn ít nhất một thể lai chuyển hoá được ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90% xyloza thành etanol trong 60 giờ và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Như nêu trên, thứ tự các việc của bước lai là không quan trọng, cũng như thứ tự các việc của bước chọn ít nhất một thể lai là không quan trọng.

Tốt hơn, nếu bước lai được tiến hành giữa:

- ít nhất một thể phân ly X chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza thành etanol, tốt hơn là ít nhất 65% xyloza, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70% xyloza, trong 60 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ, và
- ít nhất một thể phân ly Y có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu nhỏ hơn 30 giờ, tốt hơn là ngắn hơn 29 giờ, tốt hơn nữa là ngắn hơn 28 giờ, thậm chí tốt hơn nữa là ngắn hơn 25 giờ, thậm chí còn tốt hơn nữa là ngắn hơn 20 giờ.

Phương pháp theo sáng chế tùy ý có thể bao gồm bước tiến hoá trực tiếp.

Theo một phương án có lợi của sáng chế, bước tiến hoá trực tiếp được tiến hành trên thể lai không được chọn ở bước chọn theo phương pháp thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic như được xác định trên đây, với ý định nhằm khiến cho thể lai nêu trên có khả năng chuyển hoá xyloza thành etanol và/hoặc khiến cho nó chống chịu axit axetic.

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây để thu chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, phương pháp này bao gồm các bước:

- lai chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể lai,
- tiến hoá trực tiếp ít nhất một thể lai,
- chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, để thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Bước tiến hoá trực tiếp bao gồm các việc sau:

- gây đột biến, để thu được các thể đột biến, và
- nhân giống các thể đột biến này, trong môi trường tuần hoàn, dưới điều kiện thiếu oxy, trong môi trường nuôi cấy chứa xyloza và/hoặc chất ức chế lên men.

Để đơn giản hóa, các thể đột biến thu được ở cuối bước tiến hoá trực tiếp vẫn được mô tả như các thể lai.

Cụm từ “dưới điều kiện thiếu oxy” có nghĩa là dưới điều kiện không đủ oxy.

Sự thiếu hụt oxy ở đây được xác định bằng phần trăm oxy trong không khí nhỏ hơn 20%.

Tốt hơn, nếu bước gây đột biến là gây đột biến “ôn hoà”, tức là thu được bằng cách cho các tế bào nấm men tiếp xúc với bức xạ tia cực tím ở bước sóng 254 nm có mật độ nằm trong khoảng từ 100 đến 500 J/cm², ví dụ, 300 J/cm².

Các điều kiện này khiến cho tỷ lệ chết của quần thể tế bào chỉ nằm trong khoảng từ 7% đến 16% do bức xạ của tia cực tím.

Tỷ lệ chết được xác định bằng cách dàn mỏng, trên đĩa chứa môi trường có nguồn cacbon là glucoza, thể tích huyền phù tế bào giống nhau trước và sau khi gây đột biến và bằng cách so sánh với số quần thể sau 48 giờ phát triển.

Việc nhân giống các thể đột biến trong môi trường tuần hoàn, dưới điều kiện thiếu oxy, trong môi trường nuôi cấy chứa xyloza và/hoặc chất ức chế bao gồm các bước, ví dụ:

- a) nuôi cấy quần thể tế bào đã qua đột biến, trong môi trường nuôi cấy, có khuấy, dưới điều kiện thiếu oxy, tốt hơn là ở 32°C,
 - b) lấy mẫu thể tích nuôi cấy thu được ở bước a), ví dụ, một ml, và cấy lại nó vào môi trường nuôi cấy có thành phần giống như ở bước a),
- các bước a) và b) được lặp lại ít nhất 3 lần, tốt hơn là ít nhất 4 lần, ví dụ, 6 lần, 7 lần hoặc 8 lần.

Nếu chất ức chế lên men có mặt trong môi trường nuôi cấy trong khi nhân giống các thể đột biến, thì tốt hơn nếu chất đó là axit axetic.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, việc nhân giống các thể đột biến trong môi trường tuần hoàn dưới điều kiện thiếu oxy được thực hiện trong môi trường nuôi cấy chứa xyloza và không chứa axit axetic.

Ví dụ, môi trường nuôi cấy để nhân giống các thể đột biến chứa 7% xyloza.

Ví dụ về môi trường nuôi cấy để nhân giống các thể đột biến là môi trường YFX có thành phần sau: 70 g/kg xyloza, 5 g/kg dịch chiết từ nấm men, 4,7 g/kg DAP (điamoni phosphat), 11,5 g/kg axit xitric, 13,5 g/kg natri xitrat, 1 ml/kg dung dịch Tween 80, 2 ml/kg ZnSO₄ (ở nồng độ 10,6 g/l), 2,5 ml/kg MgSO₄.7H₂O (ở nồng độ 400 g/l), 1 ml/kg thiamin (ở nồng độ 18,24 g/l), 1 ml/kg pyridoxin (ở nồng độ 5,28 g/l), 1 ml/kg biotin (ở nồng độ 1,76 g/l), 1 ml/kg pantothenat (ở nồng độ 3,8 g/l), 2,5 ml/kg axit nicotinic (ở nồng độ 8 g/l), 1 ml/kg mesoinositol (ở nồng độ 50 g/l), 1 ml/kg riboflavin (ở nồng độ 1 g/l), 1 ml/kg para-aminobenzoat (ở nồng độ 1,2 g/l), độ pH được điều chỉnh đến 4,4 bằng KOH.

Ví dụ, các điều kiện thiếu oxy thu được nhờ áp suất dư riêng phần trong thiết bị được sử dụng (ví dụ, bình hoặc thùng lên men) do sự quá áp xảy ra sau sự sản sinh CO₂ trong khi lên men, và không thông gió.

Tốt hơn, nếu khoảng thời gian nuôi cấy ở bước a) là sao cho toàn bộ xyloza của môi trường này được tiêu thụ hết.

Ví dụ, khoảng thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 48 giờ. Số lượng nuôi cấy là khác nhau, ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 20.

Theo một phương án được ưu tiên, bước tiến hoá trực tiếp bao gồm việc chọn các thể đột biến có hệ hô hấp.

Thể đột biến có hệ hô hấp là thể đột biến có khả năng nhân giống dưới điều kiện chuyển hóa oxy hoá.

Cụ thể, thể đột biến có hệ hô hấp có khả năng nhân giống, dưới điều kiện ưa khí, ở nhiệt độ 30°C, trong môi trường chứa glyxerol làm nguồn cacbon duy nhất, ví dụ, môi trường chứa 20 g/kg glyxerol, 5 g/kg amoni sulfat và 1,7 g/kg môi trường YNB, môi trường YNB của Difco chẳng hạn.

Nếu môi trường nuôi cấy không chứa chất ức chế lên men, thì việc nhân giống trong môi trường nuôi cấy chứa axit axetic có thể được thực hiện sau việc nuôi cấy nhất định hoặc mỗi việc (các việc) trong môi trường tuần hoàn, để xác nhận rằng môi trường này vẫn còn chứa ít nhất một thể đột biến chống chịu axit axetic.

Tốt hơn, nếu khoảng thời gian nhân giống trong môi trường nuôi cấy chứa axit axetic dài hơn 20 giờ và ngắn hơn 75 giờ.

Ví dụ, khoảng thời gian của việc nhân giống trong môi trường nuôi cấy chứa axit axetic nằm trong khoảng từ 70 giờ đến 75 giờ.

Cũng có thể tiến hành bước chọn các thể đột biến có tốc độ sinh trưởng thích hợp, bằng cách nuôi cấy trong môi trường chứa glucoza, ví dụ, môi trường chứa 20 g/l glucoza, và chọn các thể đột biến có tốc độ sinh trưởng thích hợp.

Bước tiến hoá trực tiếp có thể cũng được thực hiện bằng cách sử dụng thể lai được chọn ở cuối bước chọn của quy trình thu chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic như được xác định trên đây, ví dụ,

để tiếp tục cải thiện khả năng chuyển hoá xyloza và/hoặc tính chống chịu axit axetic của nó.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, chủng nấm men này có thể thu được nhờ phương pháp như nêu trên.

Chủng nấm men H1 như vậy thu được nhờ phương pháp thu được chủng nấm men như nêu trên (xem ví dụ 1).

Chủng nấm men H1 chuyển hoá ít nhất 90% xyloza thành etanol dưới điều kiện kỵ khí trong 60 giờ trong môi trường YFGX và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 22 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất chủng nấm men cụ thể có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, thu được nhờ phương pháp như nêu trên, chủng nấm men này được chọn từ chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4624, chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4625 và chủng nấm men được lưu giữ ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4626.

Các chủng nấm men I-4624, I-4625 và I-4626 là các chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest ngày 24 tháng 05 năm 2012, ở CNCM, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Pháp.

Chủng nấm men số I-4624 chuyển hoá ít nhất 90% xyloza thành etanol dưới điều kiện kỵ khí trong 60 giờ trong môi trường YFGX và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 23 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Chủng nấm men số I-4625 chuyển hoá ít nhất 90% xyloza thành etanol dưới điều kiện kỵ khí trong 60 giờ trong môi trường YFGX và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 23 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Chủng nấm men số I-4626 chuyển hoá ít nhất 90% xyloza thành etanol dưới điều kiện kỵ khí trong 60 giờ trong môi trường YFGX và có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 27 giờ trong môi trường lên men YFAc.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất chủng nấm men thu được từ chủng nấm men theo sáng chế mà có cùng các tính chất này.

Do vậy, mục đích của sáng chế còn là đề xuất chủng nấm men thu được từ chủng nấm men theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, chủng nấm men thu được này có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Chủng nấm men thu được là như được xác định trên đây trong phần định nghĩa.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất nấm men thu được bằng cách nuôi cấy chủng nấm men như nêu trên hoặc bằng cách nuôi cấy chủng nấm men thu được như nêu trên.

Các nấm men thu được bằng cách nuôi cấy chủng nấm men theo sáng chế hoặc chủng nấm men thu được theo sáng chế, cụ thể như được mô tả trong “Yeast Technology”, 2nd edition, 1991, G. Reed and T.W. Nagodawithana, nhà xuất bản Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

Nói chung, việc nhân giống nấm men ở quy mô công nghiệp bao gồm ít nhất hai bước của quy trình bao gồm các bước sau:

- nhân giống chủng nấm men trong một số giai đoạn, thứ nhất dưới điều kiện bán kỵ khí và sau đó dưới điều kiện hiếu khí,
- tách bằng cách ly tâm nấm men thu được ra khỏi môi trường nuôi cấy nó, sao cho thu được nấm men dạng kem lỏng chứa chất khô với lượng nằm trong khoảng từ 12% đến 25%, hoặc thậm chí với lượng chất khô cao hơn nếu nấm men dạng kem được trộn với các sản phẩm phân giải thâm thấu,
- lọc nấm men dạng kem lỏng thu được, nói chung trong bộ lọc quay trong chân không, sao cho thu được nấm men tươi khô chứa chất khô với lượng nằm trong khoảng từ 26% đến 35%,
- trộn nấm men tươi khô này, sao cho thu được khối đồng nhất,
- ép nấm men thu được, sao cho thu được:
 - o nấm men ép ở dạng bánh nấm men tươi hoặc nấm men cục, chứa chất khô với lượng khoảng 30%, hoặc
 - o nấm men ép ở dạng hạt, nói chung là hạt, nếu nấm men được dự định để được làm khô,

- tùy ý là, làm khô theo cách tiết kiệm, trong dòng không khí nóng, bằng cách hoá lỏng chẳng hạn, các hạt nấm men thu được bằng cách ép, để thu được nấm men khô.

Tốt hơn, nếu bước làm khô là làm khô nhanh tiết kiệm với sự có mặt của chất nhũ hoá.

Trong số các chất nhũ hoá mà có thể được sử dụng ở bước làm khô, ví dụ, có thể chọn sorbitan monostearat ở nồng độ khoảng 1,0% (theo khối lượng chất khô) để sử dụng.

Các nấm men theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng có thể bất kỳ.

Ví dụ, mục đích của sáng chế là đề xuất nấm men như được xác định trên đây, khác biệt ở chỗ, nấm men này ở dạng kem của nấm men ép, nấm men khô hoặc nấm men đông lạnh sâu.

Nấm men theo sáng chế có các đặc tính tương tự như chủng nấm men mà từ đó chúng thu được bằng cách nuôi cấy, cụ thể là:

- nấm men theo sáng chế có khả năng chuyển hoá xyloza, và
- nấm men theo sáng chế chống chịu axit axetic.

Nấm men theo sáng chế đặc biệt có lợi để sản xuất rượu công nghiệp, ví dụ, được dự định để làm nhiên liệu sinh học hoặc dùng cho công nghiệp hoá học.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất phương pháp dùng để sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, phương pháp này bao gồm bước lên men, dưới điều kiện kỵ khí, nhờ nấm men như được xác định trên đây trong môi trường lên men.

Sản phẩm lên men được chọn một cách cụ thể từ etanol, sản phẩm trao đổi chất thu được từ etanol hoặc sản phẩm trao đổi chất thứ cấp.

Sản phẩm lên men được ưu tiên theo sáng chế là etanol.

Việc tạo ra etanol được thực hiện bằng cách lên men rượu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết cách làm thế nào xác định điều kiện thích hợp đối với việc lên men rượu.

Để làm ví dụ, có thể tham khảo các điều kiện lên men rượu được mô tả trong “Yeast Technology”, 2nd edition, 1991, G. Reed and T.W. Nagodawithana, nhà xuất bản Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

Môi trường lên men chứa các thành phần sau: ít nhất một nguồn cacbon, 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 khoáng chất.

Nguồn cacbon, ví dụ, được tạo ra ở dạng đường có thể được tiêu hoá ngay bởi nấm men, pentoza như xyloza, glyxerol, etanol và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn, nếu nguồn cacbon được tạo ra bởi đường có thể được tiêu hoá ngay bởi nấm men, và bởi xyloza.

Ví dụ, đường có thể được tiêu hoá ngay bởi nấm men là monosacarit của glucoza, fructoza hoặc loại galactoza, disacarit của loại sucroza và/hoặc hỗn hợp của các loại đường này.

Nguồn cacbon có thể được tạo ra ở dạng xiro glucoza, xiro fructoza, mật mía, mật sau ly tâm cấp thấp 2 (mật sau ly tâm cấp thấp thu được từ lần kết tinh thứ hai của đường), sản phẩm thuỷ phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật, và/hoặc hỗn hợp của chúng.

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

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

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

Nguồn vitamin, ví dụ, được tạo ra ở dạng mật mía, sản phẩm thuỷ phân nấm men, dung dịch vitamin tinh chế hoặc hỗn hợp các vitamin tinh chế, và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn vitamin cung cấp cho nấm men tất cả các vitamin với lượng ít nhất tương đương với nấm men được khuyến cáo trong tài liệu tham khảo. Có thể kết hợp một số nguồn vitamin với nhau.

Nguồn khoáng chất, ví dụ, được tạo ra ở dạng mật mía, hỗn hợp các muối khoáng, và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Nguồn khoáng chất cung cấp cho nấm men tất cả các nguyên tố và các nguyên tố vi lượng với lượng ít nhất tương đương với nấm men được khuyến cáo trong tài liệu tham khảo. Có thể kết hợp một số nguồn khoáng chất với nhau.

Cùng một chất có thể tạo ra một số nguyên tố khác nhau.

Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây, để sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, tốt hơn là etanol, phương pháp này bao gồm bước lên men, dưới điều kiện kỵ khí, bởi nấm men như được xác định trên đây trong môi trường lên men chứa xyloza và/hoặc ít nhất một chất ức chế lên men.

Chất ức chế lên men, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm axit hữu cơ, furfural, HMF (hydroxymethylfurfural), một hoặc nhiều hợp chất phenol, và áp suất thẩm thấu.

Axit hữu cơ, ví dụ, được chọn từ axit axetic, axit lactic, axit formic và axit levulinic.

Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất một chất ức chế lên men nêu trên là axit axetic.

Áp suất thẩm thấu có, ví dụ, trong sản phẩm thủy phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật. Sau đó, áp suất thẩm thấu sinh ra, cụ thể là từ muối được tạo ra trong phương pháp thu sản phẩm thủy phân nêu trên.

Môi trường lên men là môi trường như được xác định trên đây.

Tốt hơn, nếu môi trường lên men chứa ít nhất 0,2% xyloza, tỷ lệ phần trăm được thể hiện theo khối lượng/khối lượng của môi trường lên men.

Môi trường lên men được ưu tiên chứa xyloza với lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 7%.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, môi trường lên men cũng chứa đường có thể được tiêu hoá ngay bởi nấm men, ví dụ, glucoza.

Ví dụ, môi trường lên men có thể chứa, xyloza với lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 7% và glucoza với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 15%.

Theo một phương án được ưu tiên, môi trường lên men chứa xyloza, glucoza và axit axetic.

Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp như được xác định trên đây, để sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, tốt hơn là etanol, khác biệt ở chỗ, môi trường lên men này chứa ít nhất một sản phẩm thủy phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật.

Sản phẩm thủy phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật có thể thu được ở bước xử lý sơ bộ vật liệu thực vật, ví dụ, ở nhiệt độ cao và với sự có mặt của axit hữu cơ hoặc dung môi, tùy ý tiếp sau là thủy phân một phần hoặc toàn bộ đường polyme, bằng enzym và/hoặc hoá học và/hoặc nhiệt.

Sau đó, sản phẩm thủy phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật chứa hỗn hợp đường sinh ra từ việc thủy phân đường polyme, như xenluloza, hemixenluloza và tinh bột.

Môi trường lên men có thể cũng chứa sản phẩm thủy phân của tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật và sucroza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các đặc điểm và ưu điểm khác của sáng chế sẽ nổi bật lên thậm chí rõ ràng hơn khi đọc các phương án sau đây làm ví dụ minh họa sáng chế mà không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế, và các hình vẽ kèm theo để hiểu sáng chế.

Ví dụ 1: Thu chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic

Vật liệu và phương pháp

(i) Môi trường lên men

Môi trường nhân giống được dùng để nhân giống chủng nấm men chứa 10 g/kg dịch chiết từ nấm men, 10 g/kg pepton và 20 g/kg glucoza.

Môi trường nuôi cấy YFGX được mô tả dưới đây dùng để đo mức độ chuyển hoá của xyloza thành etanol.

Môi trường nuôi cấy YFGX được mô tả dưới đây dùng để đo tính chống chịu axit axetic.

Môi trường nuôi cấy YFGX-Ac được mô tả dưới đây dùng để đánh giá các chủng nấm men trong môi trường nuôi cấy chứa xyloza, glucoza và chất ức chế lên men, axit axetic trong cùng một thời gian.

	YFGX	YFGX-Ac
Glucoza	55 g/kg	55 g/kg
Xyloza	45 g/kg	45 g/kg
Dịch chiết từ nấm men	10 g/kg	10 g/kg
Pepton	10 g/kg	10 g/kg
Axit axetic	2000 phần triệu	8000 phần triệu
Điều chỉnh độ pH bằng KOH	độ pH 5	độ pH 5

Trong môi trường YFGX, nồng độ axit axetic là 2000 phần triệu ở độ pH 5 không có tác dụng ức chế.

Mặt khác, trong môi trường YFGX-Ac, axit axetic với nồng độ 8000 phần triệu ở độ pH 5 có tác dụng ức chế.

	YFAc
Glucoza	150 g/kg
Dịch chiết từ nấm men	5 g/kg
DAP (diamoni phosphat)	4,7 g/kg
Axit xitric	11,5 g/kg
Axit axetic	4 g/kg
Natri xitrat	13,5 g/kg
Tween 80	1 ml/kg
ZnSO ₄ (10,6 g/l)	2 ml/kg
MgSO ₄ .7H ₂ O (400 g/l)	2,5 ml/kg
Thiamin (18,24 g/l) Vit B1	1 ml/kg
Pyridoxin (5,28 g/l) Vit B6	1 ml/kg
Biotin (1,76 g/l)	1 ml/kg
Pantothenat (3,8 g/l)	1 ml/kg
Axit nicotinic (8 g/l)	2,5 ml/kg
Mesoinositol (50 g/l)	1 ml/kg
Riboflavin (1 g/l)	1 ml/kg
Para-aminobenzoat (1,2 g/l)	1 ml/kg
Điều chỉnh độ pH đến 4,4 bằng KOH	

	YFX
Xyloza	70 g/kg
Dịch chiết từ nấm men	5 g/kg
DAP (điamoni phosphat)	4,7 g/kg
Axit xitric	11,5 g/kg
Natri xitrat	13,5 g/kg
Tween 80	1 ml/kg
ZnSO ₄ (10.6 g/l)	2 ml/kg
MgSO ₄ .7H ₂ O (400 g/l)	2,5 ml/kg
Thiamin (18,24 g/l) Vit B1	1 ml/kg
Pyridoxin (5,28 g/l) Vit B6	1 ml/kg
Biotin (1,76 g/l)	1 ml/kg
Pantothenat (3,8 g/l)	1 ml/kg
Axit nicotinic (8 g/l)	2,5 ml/kg
Mesoinositol (50 g/l)	1 ml/kg
Riboflavin (1 g/l)	1 ml/kg
Para-aminobenzoat (1,2 g/l)	1 ml/kg
Điều chỉnh độ pH đến 4,4 bằng KOH	

(ii) Nhân giống chủng nấm men

Việc nhân giống chủng nấm men được thực hiện theo hai bước: bước nuôi cấy sơ bộ và tiếp sau là bước nuôi cấy.

Việc nuôi cấy sơ bộ được thực hiện bằng cách cấy quai của chủng nấm men vào 5 ml môi trường lan truyền như được xác định trên đây.

Sau 24 giờ nuôi cấy ở 30°C trong môi trường được thông khí bằng cách khuấy, lấy ra 2 ml ở bước nuôi cấy sơ bộ và cấy vào 50 ml môi trường nhân giống.

Việc nuôi cấy này được tiến hành trong 24 giờ ở 30°C trong môi trường được thông khí bằng cách khuấy.

Việc chuyển hoá xyloza thành etanol và tính chống chịu axit axetic được đo trên các tế bào nấm men thu được từ bước nuôi cấy này.

(iii) Đo mức độ chuyển hoá xyloza thành etanol

Để xác định mức độ chuyển hoá xyloza thành etanol, 0,25 g chất khô của chủng nấm men lan truyền như được xác định trên đây được cấy vào mỗi kg của môi trường YFGX.

Việc lên men được thực hiện ở 32°C, dưới điều kiện kỵ khí, bằng cách khuấy vừa phải.

Nồng độ của etanol và cả nồng độ của xyloza và glucoza được đo bởi HPLC.

Sau đó, sử dụng công thức sau đây để thu được mức độ chuyển hoá của xyloza thành etanol:

$$\% \text{ chuyển hoá} = \frac{[xyloza]_{\text{ban đầu}} - [xyloza]_{\text{cuối}}}{[xyloza]_{\text{cuối}}} \times 100$$

trong đó $[xyloza]_{\text{ban đầu}}$ tương ứng với nồng độ xyloza trong môi trường ở thời điểm cấy chủng nấm men và $[xyloza]_{\text{cuối}}$ tương ứng với nồng độ xyloza trong môi trường nuôi cấy ở thời điểm 60 giờ (kể từ khi bắt đầu cấy).

(iv) Đo tính chống chịu axit axetic

Tính chống chịu axit axetic của chủng nấm men được xác định bởi thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu.

0,25 g chất khô của chủng nấm men được nhân giống như được xác định trên đây được cấy trên mỗi kg của môi trường YFAc.

Việc lên men được thực hiện dưới điều kiện kỵ khí, ở 32°C, bằng cách khuấy vừa phải.

Mức độ tạo ra etanol được đo một cách gián tiếp bằng cách đo lượng thất thoát của bình lên men, lượng thất thoát này liên quan trực tiếp đến việc sản xuất rượu.

Đường cong lên men rượu thể hiện lượng thất thoát được tạo ra dưới dạng hàm số theo thời gian.

Điểm giao cắt giữa trục x và đạo hàm cực đại của lượng thất thoát được xác định: nó tương ứng với thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu.

Cần lưu ý rằng, đạo hàm cực đại của lượng thất thoát cho kết quả tương tự như đạo hàm cực đại tốc độ tạo ra rượu, nếu đường cong lên men rượu biểu thị sự tạo ra rượu dưới dạng hàm số của thời gian thay vì biểu thị lượng thất thoát dưới dạng hàm số của thời gian.

Khoảng thời gian thu được càng thu hẹp, thì thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu càng trở nên ngắn và tính chống chịu axit axetic của nấm men càng cao.

(v) Lai

Các chủng ban đầu được sử dụng để lai là chủng nấm men I-4538 và chủng nấm men I-4627.

Bước 1: Sự sinh trưởng của chủng nấm men

Quai của chủng ban đầu (được bảo quản ở -80°C) được cấy trên bề mặt aga của đĩa Petri chứa môi trường A.

Thành phần của môi trường A là như sau: 10 g dịch chiết từ nấm men, 10 g pepton, 20 g glucoza, 20 g aga, độ pH=6,2 +/- 0,2, nước với lượng để đủ 1 l.

Sau đó đĩa Petri được ủ trong 24 giờ ở 30°C .

Bước 2: Tạo bào tử trên môi trường 2

Quai của chủng nêu trên được cấy trên bề mặt aga của đĩa Petri chứa môi trường B.

Thành phần của môi trường B là như sau: 6,5 g natri axetat, 15 g aga, độ pH=6,5-7, nước với lượng để đủ 1 l.

Đĩa Petri được ủ trong 96 giờ ở 25°C . Sau đó, sinh khối thu được trên bề mặt đĩa được thu hoạch in 500 μl nước vô trùng. Bổ sung 25 μl zymolyaza vào 100 μl huyền phù này. Huyền phù này được ủ trong 30 phút ở 30°C , trước khi được đặt lên đĩa aga chứa môi trường 1. Tốt hơn, nếu việc phân tích tứ tử được thực hiện sau đó 20 phút.

Bước 3: Phân tích tứ tử

Các tứ tử được phân tích bằng máy vi thao tác, sau đó đĩa Petri được ủ trong 48 giờ ở 30°C .

Bước 4: Bảo quản thể phân ly

Sau đó, các thể phân ly được bảo quản ở -80°C trong môi trường 1 chứa 20% glyxerol.

Bước 5: Chọn các thể phân ly của chủng nấm men I-4538

Các thể phân ly của chủng nấm men I-4538 được chọn theo khả năng chuyển hoá xyloza thành etanol của chúng.

Mức độ chuyển hoá xyloza được đo theo mục (iii), bằng cách dùng thể phân ly được nhân giống như theo mục (ii) đối với chủng nấm men này, trừ việc đo được tiến hành sau 48 giờ thay vì sau 60 giờ.

Các thể phân ly đã được chọn chuyển hoá ít nhất 70% xyloza sau 48 giờ.

Kiểu giống của Mat a hoặc Mat alpha của các thể phân ly đã được chọn được xác định bởi PCR.

Bước 6: Chọn các thể phân ly của chủng nấm men I-4627

Các thể phân ly của chủng nấm men I-4627 được chọn dựa vào tính chống chịu axit axetic của chúng.

Tính chống chịu axit axetic được đánh giá theo mục (iv), bằng cách sử dụng thể phân ly lan truyền như theo mục (ii) đối với chủng nấm men này.

Các thể phân ly đã được chọn có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 25 giờ.

Kiểu giống của Mat a hoặc Mat alpha của các thể phân ly đã được chọn được xác định bởi PCR.

Bước 7: Lai và chọn lọc thể lai

Quai của thể phân ly đơn bội Mat alpha được cấy trên bề mặt aga của đĩa Petri chứa môi trường A. Quai của thể phân ly đơn bội Mat a được trộn với chủng đã được lưu giữ Mat alpha.

Thành phần của môi trường A là như sau: 10 g dịch chiết từ nấm men, 10 g pepton, 20 g glucoza, 20 g aga, độ pH=6,2 +/- 0,2, nước với lượng để đủ 1 l.

Sau đó, đĩa Petri được ủ trong 24 giờ ở 30°C. Quai của hỗn hợp này được cấy trên bề mặt aga của đĩa Petri chứa môi trường A. Bước này được lặp lại 5 lần.

Trong lần cấy cuối cùng, các tế bào được cấy thành vạch để thu được các quần thể cách ly. Các tế bào nấm men được lấy ra khỏi quần thể cách ly và được nuôi cấy, bộ gen ADN của chúng được chiết và tiến hành PCR trên bộ gen ADN để kiểm chứng rằng các alen Mat a và Mat alpha được dự định có mặt trong một tế bào nấm men và tế bào nấm men tương tự.

Các tế bào nấm men có các alen Mat a và Mat alpha được gọi là các thể lai.

Sau đó, các thể lai được chọn dựa vào hai tiêu chí: khả năng chuyển hoá xyloza của chúng và tính chống chịu axit axetic của chúng, các tiêu chí này được đánh giá như được thể hiện trong các mục (iii) và (iv).

Các thể lai chọn được là như sau:

- thể lai có thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu ngắn hơn 30 giờ,
- thể lai chuyển hoá được ít nhất 60% xyloza sau 60 giờ.

(vi) Tiến hoá trực tiếp

Tiến hoá trực tiếp là sự kết hợp bước gây đột biến bằng tia cực tím, sau đó làm giàu trên môi trường lên men, trong đó xyloza chỉ là nguồn cacbon.

Bước 1: Trong khi gây đột biến bằng tia cực tím, 15 ml huyền phù chứa các tế bào nấm men ở nồng độ 5% (tính theo g chất khô trong 100 g huyền phù) được đặt lên đĩa Petri có đường kính 9 cm. Sau đó, đĩa Petri được đưa vào bức xạ tia cực tím có mật độ 300 J/cm^2 ở bước sóng 254 nm.

Bước 2: Sau đó, các tế bào nấm men đã được chiếu xạ được cấy với lượng 1 g chất khô/kg môi trường YFX. Sau 96 giờ nhân giống dưới điều kiện thiếu dưỡng khí ở 32°C , 100 μl môi trường nuôi cấy được dùng để cấy vào 50 ml môi trường glyxerol chứa 20 g/kg glyxerol, 5 g/kg amoni sulfat và 1,7 g/kg môi trường YNB (Yeast Nitrogen Base) của Difco. Lần nuôi cấy thứ hai này được thực hiện dưới điều kiện ưa khí và ở 30°C trong 48 giờ.

Sau đó, lấy 1 ml dung dịch tế bào nuôi cấy này để cấy vào 170 ml môi trường YFX.

Chu kỳ này được lặp lại 8 lần.

Kết quả

Một vài thể lai thu được bằng cách lai chủng I-4627, trong đó có các thể lai H1 và H2.

Thể lai H2, không có khả năng chuyển hoá xyloza theo mục đích của sáng chế nhưng lại biểu lộ tính chống chịu axit axetic, được đưa qua bước tiến hoá trực tiếp: sau đó thu được các thể lai ED1, ED2 và ED3, lần lượt tương ứng với các chủng nấm men I-4624, I-4626 và I-4625.

Bảng 1 chỉ ra phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol sau 60 giờ trong môi trường YFGX và thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu trong môi trường YFAc (giờ) của các chủng nấm men khác nhau:

- chủng đối chứng Ac là chủng nấm men không được biến đổi gen chống chịu axit axetic, do đó nó không có khả năng chuyển hoá xyloza,
- chủng nấm men I-4538 ban đầu rất hữu hiệu để sản xuất rượu, nhưng không chống chịu axit axetic,
- chủng nấm men I-4627 ban đầu chống chịu axit axetic, nhưng không có khả năng chuyển hoá xyloza theo mục đích của sáng chế,
- thể lai H1 là chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic,
- thể lai H2 là chủng nấm men không có khả năng chuyển hoá xyloza theo mục đích của sáng chế, nhưng chống chịu axit axetic,
- các thể lai ED1, ED2 và ED3 là thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.

Bảng 1

Chủng nấm men	Phần trăm xyloza được chuyển hoá thành etanol ở 60 giờ trong môi trường YFGX	Thời gian làm chậm sự bắt đầu lên men rượu trong môi trường YFAc (giờ)
Chủng đối chứng Ac	0	12
I-4538	95	40
I-4627	60	18
H1	95	20
H2	60	25
ED1 (I-4624)	95	22
ED2 (I-4626)	95	26
ED3 (I-4625)	95	22

Hơn nữa, việc tạo ra etanol của các chủng nấm men được đánh giá trong môi trường lên men YFGX-Ac chứa đồng thời glucoza, xyloza và axit axetic làm chất ức chế lên men.

Các chủng nấm men H1, ED1, ED2 và ED3 theo sáng chế cho phép sản xuất rượu được cải thiện một cách rõ ràng so với chủng nấm men gốc I-4538 trong môi trường YFGX-Ac này (*xem Fig. 1*).

Ví dụ 2: Sản xuất rượu trong môi trường áp dụng thực tế bằng cách sử dụng các chủng nấm men theo sáng chế

Vật liệu và phương pháp

Mức độ tạo ra rượu của các chủng nấm men ED1, ED2 và ED3 được đánh giá trong môi trường áp dụng thực tế.

Mức độ tạo ra rượu của chủng nấm men I-4538 cũng được đánh giá bằng cách so sánh.

Việc đánh giá sự tạo ra rượu của các chủng nấm men được thực hiện trong hai môi trường áp dụng thực tế khác nhau:

- môi trường A chứa:
 - cơ chất hemixenluloza tương ứng với pha lỏng thu được sau khi tách các phần rắn/lỏng của sinh khối đã qua xử lý sơ bộ và thủy phân nhiệt hoá rom của cây lúa mỳ và chứa phần lớn xyloza (48 g/kg), các đường khác với lượng nhỏ, và cả các chất ức chế lên men thu được từ việc xử lý sơ bộ hoá lý sinh khối lignoxenluloza, và
 - chất dinh dưỡng (nguồn nitơ và nguồn phospho),
- môi trường B tương ứng với môi trường A nêu trên được bổ sung glucoza, để mô phỏng sản phẩm thủy phân của sinh khối lignoxenluloza, mà phần hemixenluloza của nó được thủy phân hoá và phần xenluloza của nó được thủy phân hoá một phần.

Độ pH ban đầu của môi trường A và B được điều chỉnh đến 5,5.

Thùng lên men được cấy 1,5 g/kg chất khô của chủng nấm men được đánh giá.

Việc lên men rượu được thực hiện ở 35°C.

Việc lên men cũng được thực hiện ở 32°C bằng môi trường A.

Kết quả

Các kết quả thu được với môi trường A ở 32°C và 35°C lần lượt được thể hiện trên Fig.2 và Fig.3, và kết quả thu được với môi trường B ở 35°C được thể hiện trên Fig.4.

Cần lưu ý rằng, trên Fig.3, các điểm dừng lại ở 60 giờ đối với chủng nấm men I-4538, vì đã đạt được giai đoạn bình ổn.

Các thể lai ED1 và ED2 thể hiện ưu điểm thực trong môi trường áp dụng A ở 32°C so với chủng nấm men gốc I-4538.

Các thể lai ED1, ED2 và ED3 thể hiện ưu điểm thực trong môi trường áp dụng A ở 35°C so với chủng nấm men gốc I-4538. Thực vậy, mặc dù sự tạo ra ethanol là tốt hơn ở 60 giờ đầu tiên đối với chủng nấm men I-4538, nhưng lượng ethanol cực đại được tạo ra là 6,3 g cho mỗi kg của môi trường, trong khi lượng ethanol thu được bằng các thể lai ED1, ED2 và ED3 là lớn hơn 10 g/kg.

Lại lần nữa, các thể lai ED1 và ED2 thể hiện ưu điểm thực sự trong môi trường áp dụng B ở 35°C so với chủng nấm men I-4538. Thể lai ED3 là kém trong môi trường áp dụng này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (National Collection of Microorganism Cultures - CNCM) dưới số hiệu lưu giữ I-4627.
2. Phương pháp thu được chủng nấm men có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic, phương pháp này bao gồm các bước:
 - lai chủng nấm men được lưu giữ ngày 05 tháng 10 năm 2011 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538 với chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể lai,
 - chọn ít nhất một thể lai có khả năng chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước lai nêu trên bao gồm các bước:
 - tạo bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ngày 05 tháng 10 năm 2011 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4538, để thu được ít nhất một thể phân ly X,
 - tạo bào tử của chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4627, để thu được ít nhất một thể phân ly Y, và
 - lai ít nhất một thể phân ly X với ít nhất một thể phân ly Y, trong đó thể phân ly X nêu trên chuyển hoá xyloza thành etanol và/hoặc thể phân ly Y nêu trên chống chịu axit axetic, để thu được ít nhất một thể lai.
4. Chủng nấm men có khả năng chuyển hóa xyloza và chống chịu axit axetic thu được bằng cách sử dụng phương pháp theo điểm 2.
5. Chủng nấm men có khả năng chuyển hóa xyloza và chống chịu axit axetic thu được bằng cách sử dụng phương pháp theo điểm 3.
6. Chủng nấm men theo điểm 4, trong đó chủng nấm men này được chọn từ nhóm bao gồm chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4624, chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4625 và chủng nấm men được lưu giữ ngày 24 tháng 05 năm 2012 ở CNCM dưới số hiệu lưu giữ I-4626.

7. Chủng nấm men thu được từ chủng nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó chủng nấm men thu được này chuyển hoá xyloza và chống chịu axit axetic.
8. Nấm men thu được bằng cách nuôi cấy chủng nấm men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6.
9. Nấm men thu được bằng cách nuôi cấy chủng nấm men theo điểm 7.
10. Phương pháp sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, phương pháp này bao gồm bước lên men dưới điều kiện kỵ khí bởi nấm men theo điểm 8 trong môi trường lên men.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó môi trường lên men này chứa xyloza và/hoặc ít nhất một chất ức chế lên men.
12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó môi trường lên men này chứa ít nhất một chất thủy phân trong số tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật.
13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó môi trường lên men này chứa ít nhất một chất thủy phân trong số tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật.
14. Phương pháp sản xuất ít nhất một sản phẩm lên men, trong đó phương pháp này bao gồm bước lên men dưới các điều kiện kỵ khí bởi nấm men theo điểm 9 trong môi trường lên men.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó môi trường lên men chứa xyloza và/hoặc ít nhất một chất ức chế lên men.
16. Phương pháp theo điểm 14, trong đó môi trường lên men này chứa ít nhất một chất thủy phân trong số tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật.
17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó môi trường lên men này chứa ít nhất một chất thủy phân trong số tất cả hoặc một phần vật liệu thực vật.

23900

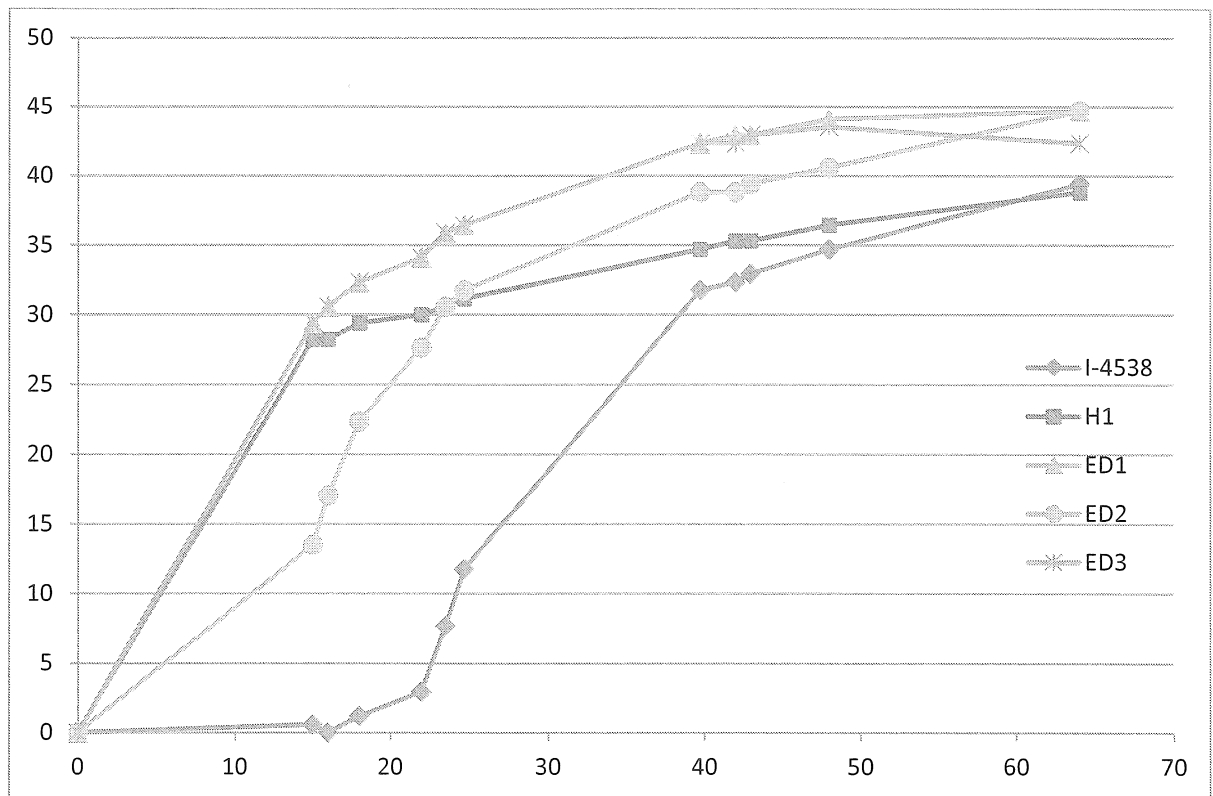


Fig.1

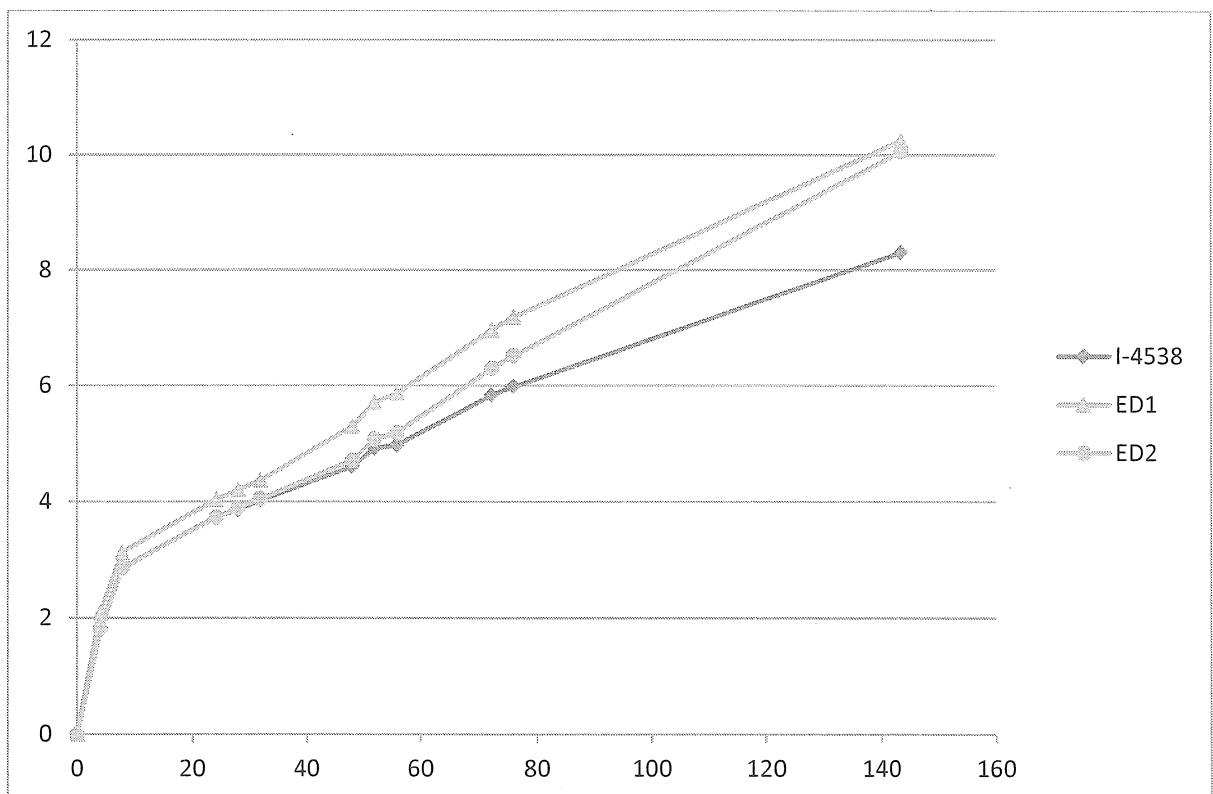


Fig.2

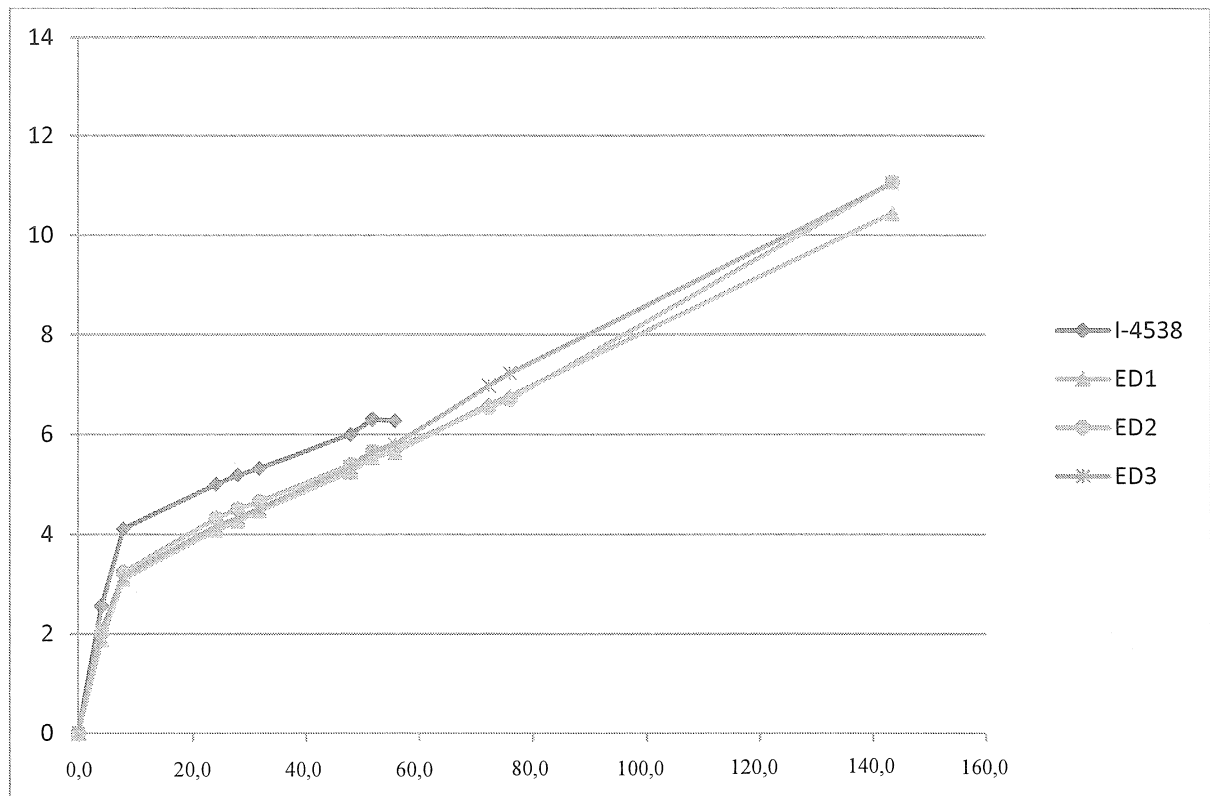


Fig.3

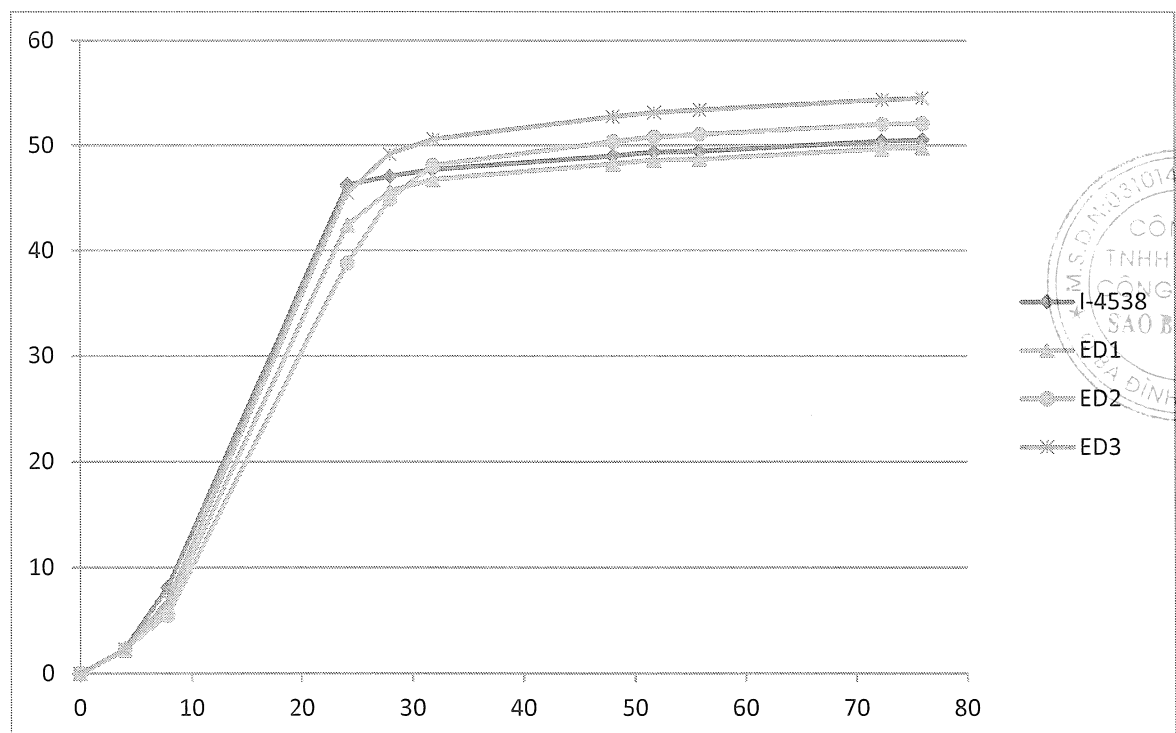


Fig.4

