

749 13/12/90

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TỔNG HỢP HÀ NỘI

GCN 91-52-136

Tên đề tài : TẠO CÁC GIỐNG NẤM MẸM MỚI BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
DI TRUYỀN HỌC ĐỂ PHỤC VỤ SẢN XUẤT VÀ NCKH.

Hà số : 52D - 01 - 10

Thuộc chương trình : CÔNG NGHỆ SINH HỌC 52D

Cơ quan thực hiện đề tài

Chủ trì đề tài



Đại học Tổng hợp Hà nội  
Tiến sĩ Lê Đình Lương  
Trưởng phòng Khoa học SX

Lê Đình Lương

GSI . Lê Đình Lương

Cơ quan quản lý

TRUNG TÂM THÔNG TIN TƯ VẤN  
KHO LƯU TRỮ  
CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU



K.T. Hoàng Vy, KVK7  
HÀ NỘI - 1990

13/12/90

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TỔNG HỢP HÀ NỘI

ĐỀ TÀI 52D-01-10

TẠO CÁC GIỐNG NẤM MEN MỚI BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
DI TRUYỀN HỌC ĐỂ PHỤC VỤ SẢN XUẤT VÀ NCKH

Chủ trì đề tài :

PGS Lê Đình Lương

Bộ môn Di truyền học

HÀ NỘI - 1990

## MUC LỤC

	Trang
I. TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU . . . . .	I
II. MỞ ĐẦU . . . . .	1
III. TÓNG KẾT TẠI LIỆU . . . . .	3
IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU . . . . .	39
1. Điều tra sinh học nòi nấm men chịu nhiệt <i>Saccharomyces cerevisiae</i> phân lập từ chuối. . . . .	39
2. Đặc điểm di truyền của một số tính trạng chống chịu và đặc tính sinh học của nòi nấm men TH-4 phân lập từ vang dầu . . . . .	44
3. Nghiên cứu sự kiểm soát di truyền một số tính trạng chống chịu ở nấm men <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	50
4. Các nòi nấm men lai mới dùng cho sản xuất bánh mì và lên men rượu . . . . .	58
5. Nghiên cứu khả năng ứng dụng một số nòi nấm men lai trong việc sản xuất cồn . . . . .	61
6. Sự sửa chữa ADN plasmid đã bị chiếu xạ ở bên trong tế bào nấm men <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	75
7. Tác dụng sửa chữa ADN bị tổn thương do tia tử ngoại của dầu gấc Việt nam . . . . .	80
V. PHỤ LỤC . . . . .	89
1. Các hợp đồng kinh tế và triển khai nghiên cứu khoa học . . . . .	89
2. Các giấy chứng nhận . . . . .	100
3. Các giấy biên nhận đơn xin cấp bằng độc quyền giải pháp hữu ích . . . . .	105
4. Phiếu kiểm nghiệm nước giải khát có ga SARO . . . . .	109
5. Nhãn nước giải khát có ga SARO. . . . .	110
6. Mẫu tham gia triển lãm thành tựu KTKT Việt Nam, Giảng Võ 1987 . . . . .	111
VI. TÀI LIỆU THAM KHẢO . . . . .	112

TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU  
ĐỀ TÀI MÃ SỐ 52D -01 -10

'TẠO CÁC GIỐNG NẤM MEN MỚI BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
DI TRUYỀN HỌC ĐỂ PHỤC VỤ SẢN XUẤT VÀ NCKH'

1. Chủ nhiệm đề tài : Giáo sư I Lê Đình Lương  
Chủ nhiệm bộ môn Di truyền học,  
khoa Sinh học, Đại học Tổng hợp Hà Nội
2. Các cán bộ nghiên cứu :
  - a. Bộ môn Di truyền học, ĐHTH Hà Nội :  
Lê Thành Lâm , Nguyễn Văn Hưng ,  
Tạ Thu Thủy , Hoàng Thủy Dương
  - b. Trung tâm Vi sinh vật ứng dụng, ĐHTH Hà Nội :  
Nguyễn Thị Hải , Đặng Dương Bằng ,  
Dương Văn Hợp
3. Các cơ quan phối hợp :
  - a. Xí nghiệp chế phẩm Vi sinh Hà Nội :  
KS Hoàng Thị Tĩnh (P. giám đốc)  
KS Phan Thị Huệ, KS Nguyễn Thị Vân
  - b. Nhà máy chế biến thực phẩm Đà Nẵng :  
KS Lê Ngô (Giám đốc)  
KS Cao Thị Thu Hương
  - c. Trung tâm sinh học thực nghiệm, thành phố Hồ Chí Minh :  
GS Nguyễn Văn Uyên (Giám đốc)  
PTS Nguyễn Ngọc Thảo , KS Lê Duy Khải
  - d. Quân Y viện 108 :  
GS Hà Văn Mạo  
BS Mai Hồng Bằng
  - e. Xưởng bia Thăng long, Đông Anh, Hà Nội :  
KS Trần Tín (Giám đốc)  
Nguyễn Văn Nhung
4. Mục tiêu :
  - a. Gây tạo và sử dụng đột biến để làm vật liệu cho chọn giống và phục vụ các NCKH khác.
  - b. Bằng các cơ chế tái tổ hợp di truyền tạo ra các giống nấm men mới để phục vụ thực tiễn như : sản xuất oản, chế biến bột mì, sản xuất các chế phẩm giàu vitamin, axit amin ...
  - c. Thêm dò nghiên cứu di truyền học nấm men ở mức phân tử.
5. Thời gian thực hiện : 1986 - 1990 .

## TỔNG TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

## A. MỘT SỐ SỐ LIỆU :

1. Đã phân lập, thu thập 500 nòi nấm men từ các nguồn khác nhau.
2. 22 nòi đã được đưa vào nghiên cứu di truyền học.
3. Đã tách 6.238 nang bằng máy vi thao tác.
4. Đã ghép 6.666 cặp lai và tiến hành 715 phép lai khác.
5. Đã tạo ra được 162 nòi lai.
6. Đã phân tích 9 nòi lai.

B. CHỌN GIỐNG NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* TRÊN CƠ SỞ CÁC NGUYÊN LÝ DI TRUYỀN HỌC :I. Nghiên cứu cơ bản :

1. Phát hiện tính dị hợp tử về tính trạng chịu nhiệt ( $42^{\circ}\text{C}$ ), chịu cồn (14%) và chịu axit (pH = 2) ở một số nòi nấm men phân lập ở Việt nam.
2. Tính chịu áp suất thẩm thấu cao (60% glucose), chịu nồng độ ri đường cao (28° Brix) là do các gen trội nằm trong tế bào chất qui định.
3. Tính chịu axit chịu sự kiểm soát của cả các gen trong nhân và gen tế bào chất.
4. Tính chịu nhiệt, chịu cồn do các gen trong nhân kiểm soát.
5. Khả năng tích lũy sinh khối được qui định bởi các gen trội nằm trong nhân.
6. Đã tạo ra được 34 nòi vừa mang dấu chuẩn di truyền ( $leu^{-}$ ,  $asp^{-}$ ,  $met^{-}$  ...) vừa mang tính chịu nhiệt hoặc chịu cồn để làm vật liệu khởi đầu cho các phép lai sau này.
7. Đã gây tạo được hai đột biến nhân ( $leu^{-}$ ,  $met^{-}$ ) và một đột biến tế bào chất ( $pet^{-}$ ) để làm dấu chuẩn di truyền.

II. Nghiên cứu ứng dụng :

1. Đã tạo ra được 4 nòi lai có ý nghĩa kinh tế. Trong đó 3 nòi có thể dùng để sản xuất sinh khối ở nhiệt độ cao  $33^{\circ}\text{C}$  -  $42^{\circ}\text{C}$ , một nòi dùng để sản xuất cồn cũng ở biên độ nhiệt độ nói trên và một nòi đa năng có thể sử dụng vừa để sản xuất sinh khối men bánh mì ở nhiệt độ dao động vừa để làm cồn và làm nước giải khát lên men.

2. 3 nòi lai cho sinh khối và hàm lượng axit amin cao hơn nòi thương phẩm nhập nội dự kiến sản xuất lớn tại xí nghiệp chế phẩm vi sinh Tương mai Hà nội.
3. 4 nòi lai khác có triển vọng ứng dụng thực tiễn sẽ được kiểm tra tiếp và tối ưu hóa môi trường để giới thiệu cho sản xuất.
4. Đã tạo ra qui trình lên men yếm khí hai giai đoạn bên trong chai để sản xuất nước ngọt có ga với chất lượng cao và các sản phẩm lên men khác.
5. Đã đăng ký hai giải pháp hữu ích tại Cục Sáng chế UBKH Nhà nước.
6. Đã thực hiện 6 hợp đồng với các cơ sở sản xuất và NCKH.
7. Các sản phẩm cụ thể :
  - Nước giải khát có ga SARO.
  - Viên đạm SARO
  - Chế phẩm giàu vitamin A : GACAVIT
  - Tham gia triển lãm thành tựu KTKT toàn quốc, Giảng Võ 1987

#### C. DI TRUYỀN HỌC PHÂN TỬ NẤM MEN :

1. Hoàn thiện các phương pháp tách chiết plasmid và chuyển ADN plasmid vào các tế bào nấm men *S. cerevisiae*.
2. Nghiên cứu cơ chế và khả năng sửa chữa ADN plasmid và ADN trong nhân ở *S. cerevisiae*.

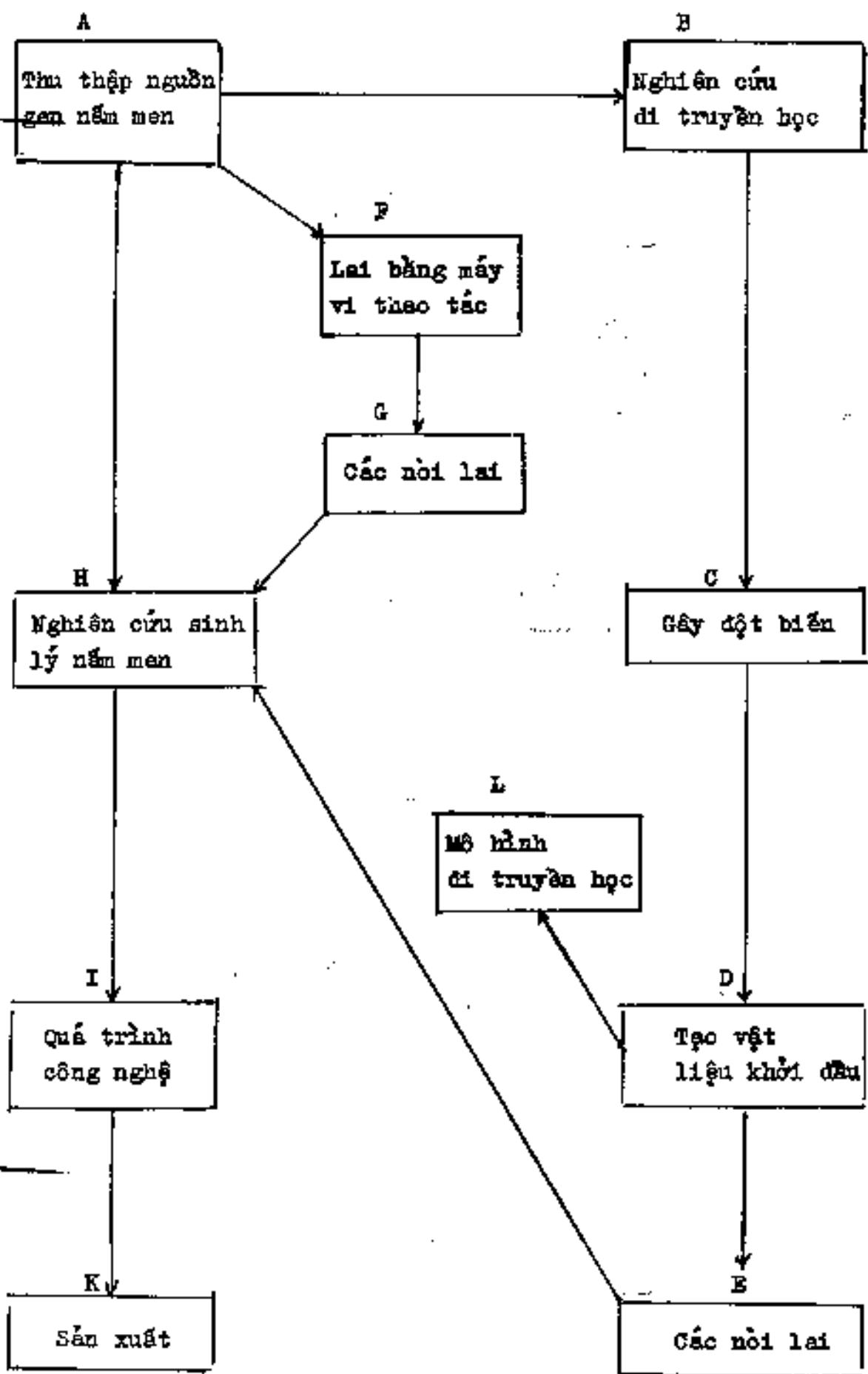
#### D. MÔ HÌNH DI TRUYỀN HỌC :

1. Hình thành mô hình di truyền học để kiểm tra khả năng sửa chữa và phục hồi ADN bị sai hỏng của các chất.
2. Phát hiện khả năng có thể sửa chữa ADN bị sai hỏng do tia UV và tia X của dầu gấc Việt Nam.
3. Đóng góp một phần cơ sở khoa học cho việc sản xuất chế phẩm GACAVIT từ gấc.

#### E. CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ :

1. Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm, Lê Đình Lương. Điều tra sinh học nòi nấm men chịu nhiệt *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ chuối. Tạp chí Sinh học số 3, 1987, Hà nội, tập 9, tr. 7.
2. K. Planqué, J. Lekkerkerk, C.P.M. Backendorf, Lê Đình Lương, P. van de Putte. Sự biểu hiện của các protein UvrA và UvrB của *E. coli* bên trong *S. cerevisiae*. Tạp chí 'GENE', 1987.

3. Lê Đình Lương. Tạo giống nấm men mới bằng con đường tái tổ hợp gen. Báo cáo Hội thảo khoa học 'Vi sinh vật học phục vụ ba chương trình kinh tế'. Hà nội 5/1987. tr.2.
4. Lê Đình Lương, Hà Văn Kẹo, Mai Hồng Bằng. Tác dụng sửa chữa ADN bị tổn thương do tia tử ngoại của đầu gối Việt nam. 'Di truyền học và ứng dụng', số 2, 1988, tr.8.
5. Lê Thành Lâm, K. Planqué. Sự sửa chữa ADN plasmid đã bị chiếu xạ ở bên trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. 'Di truyền học và ứng dụng', số 1, 1988, tr.6.
6. Lê Đình Lương, Nguyễn Văn Hưng, Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm, Sự kiểm soát di truyền đối với các tính trạng chống chịu ở *Saccharomyces cerevisiae*. Tạp chí 'GENOME', V.30, 1988, tr.488.
7. Lê Đình Lương, Nguyễn Văn Hưng. Đặc điểm di truyền của một số tính trạng chống chịu ở nòi nấm men TH-4 phân lập từ vang dâu. 'THÔNG TIN KHOA HỌC CÁC TRƯỜNG ĐẠI HỌC', số 2, 1988.
8. Lê Đình Lương, Mai Hồng Bằng. Mô hình di truyền học để kiểm tra khả năng sửa chữa ADN của thuốc. Genome, Vol.30, Supp.1. p. 412, 1988.
9. Lê Thành Lâm, Nguyễn Thị Mùi, Lê Đình Lương. Những nòi nấm men lai mới dùng cho sản xuất men bánh mì và cồn. 'Di truyền học và ứng dụng', số 1, 1989. tr. 36-38.
10. Nguyễn Văn Hưng, Lê Đình Lương. Phân tích và tổng hợp di truyền các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có ý nghĩa kinh tế. Báo cáo Hội nghị khoa học, trường ĐHTH Hà nội, 1989, tr.4.
11. Tạ Thu Thủy. Lai tạo giống nấm men có ý nghĩa kinh tế. Luận văn tốt nghiệp. 1989.
12. Nguyễn Văn Hưng, Dương Văn Hợp, Lê Đình Lương. Nghiên cứu khả năng ứng dụng một số nòi nấm men lai trong sản xuất cồn. 'KHKT nông nghiệp', số 2, 1990.
13. Nguyễn Văn Hưng, Lê Đình Lương. Nghiên cứu sự kiểm soát di truyền một số tính trạng chống phỉu ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. 'Di truyền học và ứng dụng', số 1, 1990.
14. Hoàng Thùy Dương. Nghiên cứu ứng dụng các nòi nấm men lai *S. cerevisiae* vào sản xuất các chế phẩm giàu dinh dưỡng. Luận văn tốt nghiệp, 1990.
15. Nguyễn Văn Hưng. Nghiên cứu đặc điểm di truyền học của một số tính trạng chống chịu và lai tạo các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có ý nghĩa kinh tế. Luận án PTS, 1990.



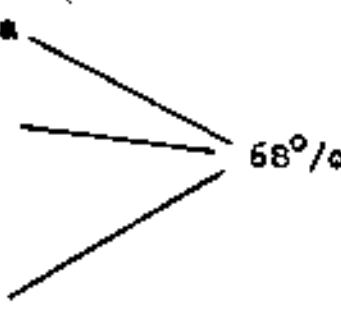
CÁC KÝ HIỆU LI TRUYỀN

1. The (thermotolerance) : phenotyp về tính chống chịu nhiệt (The<sup>+</sup>: mọc được ở 42°C, The<sup>-</sup> : không mọc được ở 42°C).
2. Alc (alcohol tolerance) : phenotyp về tính chống chịu cồn. (Alc<sup>+</sup>: mọc được ở 14 o/o /v/v/ethanol. Alc<sup>-</sup> : không mọc được ở 14 o/o ethanol).
3. Aci (acid tolerance) : phenotyp về tính chống chịu axit (Aci<sup>+</sup> : mọc được ở pH - 2, Aci<sup>-</sup> : không mọc được ở pH-2).
4. Osm (Osmotolerance) : phenotyp về tính chống chịu với áp suất thẩm thấu cao (Osm<sup>+</sup> : mọc được ở 60 o/o /w/v/glucose, Osm<sup>-</sup> : không mọc được ở 60 o/o glucose).
5. Mol (Molasse resistance) : phenotyp về tính chống chịu với nồng độ cao của rỉ đường (Mol<sup>+</sup> : mọc được ở 28°Brix của rỉ đường, Mol<sup>-</sup> : không mọc được ở 28°Brix của rỉ đường).
6. Bio (Biomass accumulation) : phenotyp về khả năng tích lũy sinh khối (Bio<sup>+</sup> : có khả năng tích lũy sinh khối cao gấp ít nhất hai lần Bio<sup>-</sup> ).
7. Ho (Homothaliam) : phenotyp về tính đồng tảo (Ho<sup>+</sup> : có khả năng tự lưỡng bội hóa, Ho<sup>-</sup> : không có khả năng tự lưỡng bội hóa).
8. Các dấu chuẩn hóa sinh được ký hiệu bằng 3 chữ cái đầu của nhân tố mà nói đột biến mất khả năng sinh tổng hợp (thí dụ : Ade<sup>-</sup> - mất khả năng tổng hợp adenine , Lys<sup>-</sup> - mất khả năng tổng hợp Lysine ...).
9. Rad (Radiation) : tính trạng miễn cảm với các tia UV và tia X (Rad<sup>+</sup> : không miễn cảm với tia UV và tia X, Rad<sup>-</sup> : miễn cảm với tia UV và tia X).

## MỞ ĐẦU

Hơn 6000 trước đây người Ai-Cập đã biết làm tăng hương vị và độ nở bột của bánh mì bằng cách để bột mì đã nhào vài ngày trước khi đem nướng. Thậm chí trước đó nữa người Sumerian đã khắc lên bia đá phương pháp lên men để làm cốm. Ngày nay, chúng ta đều biết cả hai việo làm này dựa trên hoạt động sống của nấm men Saccharomyces cerevisiae và một vài loài gần gũi. ~~Nội-khoa học~~ hiện đại bắt nguồn từ kiến thức cổ điển đó đã chiếm vị trí đặc biệt trong đời sống loài người, được gọi là CÔNG NGHỆ SINH HỌC (CNSH) (1).

Ngoài tác dụng làm nở bột mì, làm cốm, nấm men từ lâu đã được dùng để sản xuất các loại đồ uống rất đa dạng như bia, vang, sưa, sữa, nước ngọt có ga; dùng để sản xuất sinh khối giàu đạm và vitamin, nhiều dược phẩm quý, đất tằm, các hoạt chất sinh học dùng trong các phòng thí nghiệm sinh học và y học hiện đại. Theo tài liệu quốc tế năm 1984, các sản phẩm từ nấm men chiếm gần 70 % tổng số các sản phẩm CNSH toàn thế giới :

1) Bia (x)	24 tỷ đôla		
2) Kháng sinh	12	"	
3) Rượu vang (x)	9- 12	"	
4) Sản phẩm sưa	3	"	
5) Steroid	3	"	
6) Axit amin	1,3	"	
7) Nấm men (x)	0,7	"	
8) Enzym	0,4	"	
9) Axit citric	0,3	"	
<b>Tổng số :</b>	<b>53,7 tỷ đôla</b>		

Trong những năm tới, số lượng và chủng loại các sản phẩm từ nấm men sẽ còn tăng lên nhanh chóng do việc sử dụng kỹ thuật di truyền đưa những gen xác định từ động vật, thực vật vào nấm men và dùng nấm men như những 'nhà máy tí hon' nhưng năng suất rất cao, để sản xuất những hoạt chất mà trước đây chỉ tách chiết được với số lượng ít ỏi và rất khó khăn từ các bộ phận của thực vật, động vật như các enzym, hormon v.v...

(1) Theo tạp chí 'BIOTECHNOLOGY IN THE NETHERLANDS', June 1988.

Về mặt sinh học nấm men là sinh vật đơn bào và nhân chuẩn (eukaryotic).

Là sinh vật đơn bào, nấm men có bộ máy di truyền nhỏ (chỉ to hơn vi khuẩn *E.coli* có 4 lần), có thời gian nhân đôi ngắn (1-2 giờ) và do vậy có thể tiến hành các thí nghiệm với nấm men nhanh chóng và dễ dàng như với các sinh vật nhân sơ (prokaryotic).

Là sinh vật nhân chuẩn, nấm men được sử dụng để nghiên cứu những vấn đề hết sức phức tạp của sinh vật bậc cao (nhân chuẩn) như cấu trúc của nhiễm sắc thể, cơ chế nguyên phân và giảm phân, cơ chế cắt tách intron của ARN v.v...

Nấm men lại là đối tượng sinh vật được nghiên cứu rất đầy đủ về mặt di truyền học. Hàng trăm gen có những chức năng khác nhau đã được xác định vị trí trên bản đồ di truyền gồm 17 nhiễm sắc thể. Điều đặc biệt quan trọng và hấp dẫn đối với các nhà nghiên cứu là có thể duy trì nấm men ở mức bội thể xác định với thời gian mong muốn, do vậy có thể dễ dàng và nhanh chóng nghiên cứu hàng loạt những vấn đề cơ bản của di truyền học truyền thống (conventional genetics).

Ngày nay, với sự xuất hiện và ngày càng phổ biến của công nghệ ADN tái tổ hợp (kỹ thuật di truyền) nấm men đang dần dần chiếm vị trí trung tâm của lĩnh vực nòng cốt này của CNSH hiện đại. Về nguyên tắc có thể đưa bất kỳ gen nào của bất kỳ sinh vật nào (từ virus đến con voi) vào tế bào nấm men và được gen đó biểu hiện. Ưu việt này của nấm men hiện chưa sinh vật nào có, kể cả vi khuẩn *E.coli*, đối tượng đang được dùng phổ biến nhất trong kỹ thuật di truyền, vì nó là sinh vật nhân sơ. Trên thực tế, cả một hệ thống các phương pháp đã được hoàn thiện và đang được các nhà nghiên cứu sử dụng rất thành thạo để biến đổi cấu trúc di truyền của nấm men theo ý muốn. Đã thu được hàng loạt những kết quả đầu tiên có ý nghĩa thực tiễn trực tiếp như: chuyển được gen sinh glucoamilase từ *Aspergillus niger* sang nấm men, tạo ra nòi nấm men sử dụng lactose như nguồn carbon duy nhất, dùng nấm men sản xuất các polypeptid tái tổ hợp (recombinant) để chẩn đoán và chữa các bệnh về miễn dịch ở người, sản xuất vacxin chống viêm gan siêu vi trùng bằng nấm men, dùng nấm men như vật trung gian chuyển gen từ vi khuẩn sang thực vật v.v...

Tiến hành đề tài này chúng tôi nhằm áp dụng các nguyên lý di truyền học để tạo ra các giống nấm men mới phục vụ sản xuất và nghiên cứu khoa học; đồng thời thăm dò một số nghiên cứu di truyền học phân tử để nâng cao trình độ khoa học cơ bản.

TỔNG KẾT TÀI LIỆU

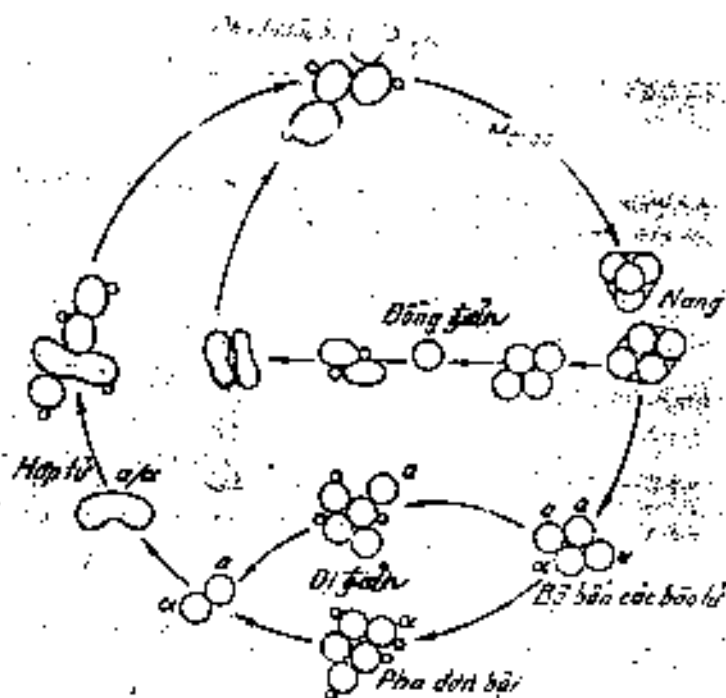
I. Đặc điểm sinh học và ứng dụng kinh tế của nấm men Saccharomyces cerevisiae :

1. Đặc điểm sinh học của nấm men Saccharomyces cerevisiae :

Nấm men *S. cerevisiae* có đầy đủ những đặc điểm ưu việt của một đối tượng nghiên cứu di truyền học. Đó là tốc độ sinh sản nhanh, điều kiện nuôi cấy đơn giản, các pha lưỡng và đơn bội trong chu trình sống rõ ràng và có thể điều khiển được. *S. cerevisiae* là loại sinh vật đơn bào, kích thước là  $3-30\mu$  và  $3-10\mu$ ; có cấu tạo tế bào nhân chuẩn điển hình, vì vậy nó là mô hình thuận tiện để nghiên cứu cơ sở phân tử của tính di truyền và biến dị ở sinh vật nhân chuẩn nói chung [3, 13, 17].

*S. cerevisiae* có nhiệt độ sinh trưởng tối ưu trong khoảng  $27^{\circ}\text{C} - 33^{\circ}\text{C}$  và pH tối ưu là 4,5 - 5,5 [18, 19], chúng sinh sản theo lối nảy chồi, giai đoạn sinh dưỡng thường là lưỡng bội. Trên môi trường đặc biệt (môi trường sinh bào tử) thì tế bào lưỡng bội giảm phân tạo thành nang chứa 4 bào tử ở bên trong. Tuy nhiên ở phần lớn nấm men *Saccharomyces* đã được nghiên cứu có thể quan sát thấy các nang chứa ít hơn 4 bào tử (1 đến 3 bào tử) và trong một số ít trường hợp có thể hình thành các nang với số lượng bào tử lớn hơn 4 (5 đến 8 bào tử). Trường hợp trong nang ít hơn 4 bào tử có thể là do một vài nhân hình thành trong nang không tham gia vào quá trình hình thành bào tử [136], hoặc là 2 nhân hình thành nên một bào tử [169]. Còn các nang với số lượng bào tử lớn hơn 4 có thể là do sự phân chia nguyên phân bổ sung của các nhân sau phân chia giảm phân, hoặc chúng có thể được hình thành từ các tế bào mang 2 nhân lưỡng bội [59].

Khí nảy men trên môi trường dinh dưỡng 2 bào tử thường giao phối với nhau hình thành nên hợp tử lưỡng bội, ngay sau đó hợp tử này sinh sản bằng cách nảy chồi [3, 13, 17] (H.1)



Hình 1. Chu trình sống của *Saccharomyces* [3].

Tế bào đơn bội được phân biệt với tế bào lưỡng bội và một số đặc điểm. Trong trường hợp điển hình thì tế bào đơn bội thường có kích thước nhỏ hơn, có dạng hình cầu, có khả năng giao phối và không sinh bào tử; trong khi đó tế bào lưỡng bội thường có dạng hình dài hay hình oval, không có khả năng giao phối và có khả năng sinh bào tử [3, 13, 17].

Khi nuôi cấy lâu dài trong phòng thí nghiệm khả năng giao phối của các nòi đơn bội có thể giảm nhiều và cuối cùng có thể dẫn tới sự bất thụ. Các đột biến gen về giới tính hoặc các biến đổi của các gen sửa đổi kiểm soát sự giao phối là nguyên nhân của hiện tượng này. Tuy nhiên cũng có nhiều nòi đơn bội có thể duy trì được khả năng giao phối trong một thời gian dài [104]. Để có thể giao phối trước tiên các tế bào phải kết dính với nhau. Bằng các phương pháp nghiên cứu hóa sinh người ta đã xác định được rằng nhân tố kết dính là một phức hệ protein - mannan, trong đó hàm lượng protein dao động từ 10 - 30% [157]. Các phân tích di truyền cho thấy nhân tố kết dính luôn luôn phân ly cùng với alen giới tính điều đó cho thấy sự liên kết chặt chẽ giữa các gen quy

định các tính trạng này [169]. Người ta đã xác định rằng các nòi đơn bội  $a$  và  $\alpha$  bài tiết vào môi trường các hormon sinh dục, việo tách và xác định các hormon này cho thấy về bản chất chúng là steroid [172].

Dựa vào cách hình thành thể lưỡng bội trong chu trình sống mà nấm men được chia thành hai loại : nấm men đồng tản và nấm men dị tản.

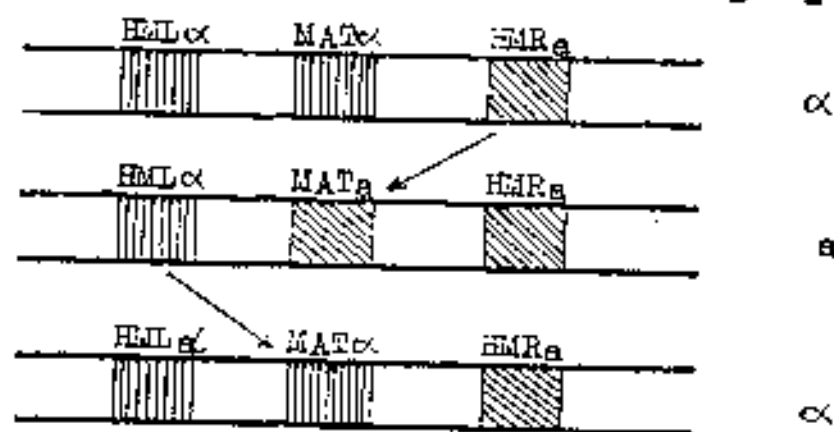
Nấm men dị tản là loại nấm men mà thể lưỡng bội được tạo thành do sự giao phối của các bào tử hoặc tế bào đơn bội mang giới tính khác nhau là  $a$  và  $\alpha$ . Trong nang có 4 bào tử thì 2 bào tử mang alen giới tính  $a$  và 2 bào tử mang alen giới tính  $\alpha$ . Locut mang gen giới tính này trên nhiễm sắc thể thứ III.

Nấm men đồng tản là loại nấm men mà sự giao phối có thể xảy ra giữa 2 bào tử hay 2 tế bào đơn bội bất kỳ, chẳng vì thế mà ở loại nấm men này không duy trì được trạng thái đơn bội [3, 13, 17]. Có 3 gen đóng vai trò quan trọng đối với giới tính là HO, HML, HMR. Gen HO có tác dụng ức chế các alen MAT $a$  và MAT $\alpha$ , vì vậy nó cần thiết để tế bào có thể tự lưỡng bội hóa. Tất cả các nòi mang gen ho đều là dị tản. Do sự có mặt của các alen HML, HMR khác nhau mà có 4 kiểu nòi đồng tản ở nấm men Saccharomyces như sau (Bảng 1).

Bảng 1 : Sự kiểm soát di truyền đối với giới tính ở nấm men Saccharomyces.

Tế bào lưỡng bội	Kiểu phân ly	Genotyp của nòi HO / EO
Kiểu HO I	4 đồng tản (kiểu HO I)	HML $a$ MAT $a$ HMR $\alpha$
		HML $a$ MAT $\alpha$ HMR $\alpha$
Kiểu HO II	4 đồng tản (kiểu HO II)	HML $\alpha$ MAT $a$ HMR $a$
		HML $\alpha$ MAT $\alpha$ HMR $a$
Hp	2 đồng tản (Hp) 2 dị tản ( $\alpha$ )	HML $\alpha$ MAT $a$ HMR $\alpha$
		HML $\alpha$ MAT $\alpha$ HMR $\alpha$
Hq	2 đồng tản (Hq) 2 dị tản ( $a$ )	HML $a$ MAT $a$ HMR $a$
		HML $a$ MAT $\alpha$ HMR $a$

Các tế bào HO HMR<sub>a</sub> HML<sub>a</sub> MAT<sub>a</sub> là tế bào đơn bội a bền vững, các tế bào HO HMR<sub>α</sub> HML<sub>α</sub> MAT<sub>α</sub> là tế bào α bền vững [769] giới tính ở nấm men được xác định theo kiểu chuyển đổi cassette (hình 2). Ở giữa nhiễm sắc thể III là gen xác định giới tính, hai đầu là các gen xác định giới tính a và α. Ba gen này giống nhau về cấu trúc. Khi bản sao của a nằm ở giữa thì nòi đó mang giới tính a và khi bản sao của α nằm ở giữa thì nòi đó mang giới tính α. Locus giới tính (MAT<sub>a</sub> hoặc MAT<sub>α</sub>) kiểm soát quá trình sản xuất pheromon sinh dục, phản ứng kết dính, sự giao phối và quá trình sinh bào tử [769].



Hình 2. Cơ chế cassette xác định giới tính ở nấm men.

## 2. Ứng dụng kinh tế của nấm men *S. cerevisiae* :

Trong suốt nhiều thế kỷ nấm men được sử dụng vào nhiều mục đích kinh tế khác nhau. Chẳng hạn, người Ai Cập đã biết làm nở bột mỳ bằng nấm men có trong không khí từ 6000 năm về trước. Thậm chí trước đó nữa người Sumerian đã khắc lên bảng đá quy trình làm cốm cũng dùng hoạt động sinh-học của nấm men đơn bào [733].

Khi kể đến phạm vi ứng dụng của nấm men người ta có thể liệt kê một số ngành sản xuất sau [717].

- Công nghiệp sản xuất bánh mỳ.
- Công nghiệp sản xuất cốm, đồ uống alcohol và rượu vang.
- Sản xuất các sản phẩm dinh dưỡng hay thức ăn chăn nuôi hoặc là dưới dạng tinh khiết hoặc dưới dạng dịch chiết nấm men sau khi cho tự phân.

- Sản xuất các phức hệ vitamin (đặc biệt là phức hệ vitamin B), axit amin v.v... phục vụ cho dược học và các nghiên cứu về vi sinh vật học.

- Sản xuất axit nucleic, các enzym và các chất khác.

Theo một số tác giả khác thì việc sử dụng nấm men trong công nghiệp có thể chia thành 3 nhóm phụ thuộc vào thành phần hóa sinh của sản phẩm thu được (bảng 2) [151].

**Bảng 2.** Các ứng dụng công nghiệp của nấm men [151]

Thành phần tế bào				Các sản phẩm tiết	Tương tác enzym- cơ chất
Nấm men khô	Thành phần cơ bản	Hợp chất chiết	Sản phẩm cơ sở		
- Thức ăn cho nuôi	- Lipit	- Coenzym	- Axit amin	- Bia	- Sử dụng sữa ( <i>K. fragilis</i> )
- Thức ăn	- Protein	- Vitamin	- Purin	- Rượu vang	- Sử dụng tinh bột (quả trình symba)
- Protein đơn bào			- Piri- midin	- Rượu táo	- Sản xuất men totriosa ( <i>S. uvarum</i> )
				- Rượu mạnh	- Cồn nhiên liệu
				- Glycerin	
				- Khí CO <sub>2</sub>	

Sở dĩ nấm men có được những ứng dụng rộng rãi như vậy là do chúng có thể chuyển hóa nhanh chóng và biến đổi có hiệu quả các đường thành cồn và CO<sub>2</sub> (chẳng hạn như đường cổ trong các dịch chiết ngũ cốc, dịch nho, sữa v.v...). Người ta thường nói rằng nấm men là "thực vật" được nuôi trồng lâu đời nhất. Saccharomyces là một trong hai chi nấm men được quan tâm nhất, trong đó loài *S. cerevisiae* và những loài có quan hệ gần được đặc biệt chú ý. Chúng liên quan mật thiết với việc sản xuất bánh mì, sản xuất cồn và chúng có giá trị đặc biệt do có khả năng trao đổi chất kỵ khí và trao đổi chất hiếu khí rất có hiệu quả [151]. Từ trước đến nay người ta vẫn dùng nấm men để sản xuất cồn từ nguồn nguyên liệu phế thải của công nghiệp sản xuất đường, nhưng do sự tăng nhanh về giá dầu trên thế giới mà ngày

Này vấn đề sản xuất còn nhờ nấm men lại được quan tâm trở lại, lượng còn được sản xuất hàng năm trên thế giới vượt hơn 2 triệu tấn [151].

Nấm men chứa tới 50% protein, một số lượng lớn các vitamin (đặc biệt là các vitamin nhóm B) và có một phức hệ các enzyme khác nhau. Trong protein của nấm men thấy có hầu hết các axit amin, trong đó có những axit amin không thay thế như lizin, methionin, triptophan ... Người ta bổ sung nấm men khô hoặc dịch chiết nấm men vào thức ăn chăn nuôi để làm tăng mùi vị và chất lượng của nó. Việc sản xuất nấm men cho thức ăn chăn nuôi ngày càng phát triển, thí dụ cứ 10 bê lên men có nặng suất 100.000 tấn nấm men khô trong 1 năm trên diện tích 5000m<sup>2</sup> tương ứng với số lượng protein thu được từ 90.000ha đất cây cây màu mỡ trồng đậu tương [17].

Các dẫn liệu trên đây cho ta thấy vai trò quan trọng của nấm men đối với loài người.

## II. Một số đặc tính chống chịu có liên quan đến sản xuất của các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* :

### 1. Tính chống chịu cồn :

Nấm men *Saccharomyces* là các sinh vật nhân chuẩn chống chịu cồn nhất và khả năng chống chịu này phụ thuộc vào nòi [40, 85], chúng có thể mọc trên môi trường có nồng độ 8% - 14% (v/v thể tích / thể tích) <sup>cồn</sup>. Tính chống chịu cồn là dấu hiệu di truyền và do hệ thống đa gen kiểm soát [21, 80, 138]. Ngoài ra tính chống chịu cồn còn chịu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường ngoài như nhiệt độ, áp suất thẩm thấu v.v... [40].

#### a. Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu lên tính chống chịu cồn:

Nồng độ cơ chất cao có thể gây ra sự ức chế trực tiếp hay gián tiếp đối với sự sinh trưởng và lên men của nấm men bởi việc gây ra áp suất thẩm thấu cao và nồng độ cồn cao [67]. Nói chung người ta bắt đầu chú ý tới ảnh hưởng ức chế của cơ chất đối với khả năng lên men của nấm men khi mà nồng độ đường nằm trong khoảng 15 - 25% (w/v = trọng lượng / thể tích) [86]. Khi làm thí nghiệm với nòi nấm men *S. cerevisiae* 7754 kết quả cho thấy nồng độ 40%

(w/v) glucoza sẽ ức chế hoàn toàn sự lên men của nôi này [71]. Bản chất của đường cũng có vai trò quan trọng, thí dụ ở cùng một nồng độ nhưng glucoza sẽ ức chế mạnh hơn sacaroza do glucoza tạo áp suất thẩm thấu lớn hơn sacaroza 1,73 lần [156]. Tuy nhiên người ta thấy rằng nồng độ cơ chất gây ra sự ức chế sự sinh trưởng (5% [w/v] glucoza) thấp hơn nhiều nồng độ gây ra sự ức chế sự lên men [154].

Cho mãi đến gần đây người ta mới quan tâm đến việc tìm hiểu các mối quan hệ trực tiếp hay gián tiếp giữa áp suất thẩm thấu và tính chống chịu cồn. Những nghiên cứu đầu tiên về vấn đề này cho thấy khi nấm men *Saccharomyces* được lên men thích nghi với nồng độ glucoza cao hơn (tức là với áp suất thẩm thấu tăng lên) thì tính chống chịu cồn lại giảm xuống [63]. Bằng chứng là khi lên men với nồng độ cơ chất cao thì độ cồn được tạo ra thấp hơn đáng kể so với nồng độ cồn cần thiết thêm vào để ức chế sự lên men trong trường hợp lên men với nồng độ cơ chất thấp (tức là tính chống chịu cồn trong trường hợp trên giảm xuống) [62]. Những kết quả như vậy cho thấy có một sự tương tác giữa áp suất thẩm thấu và tính chống chịu cồn. Một sự giải thích có thể chấp nhận được đối với những kết quả nghiên cứu này không được đặt ra mãi cho đến khi người ta phát hiện ra ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu lên sự sản sinh và tiết cồn ở nôi nấm men bia nhẹ *S. uvarum* [130]. Sự lên men được tiến hành ở 10% (w/v) sacaroza và mức áp suất thẩm thấu được tăng lên do việc thêm sorbitol vào từ 0% đến 30% (w/v) với số gia 5%. Sorbitol làm tăng áp suất thẩm thấu bởi nó là một hydratoacbon có thể bị nấm men bia hấp thụ nhưng lại không được chuyển hóa [175]. Người ta thấy rằng khi nồng độ sorbitol tăng từ 0% đến 30% thì nồng độ cồn cuối cùng trong dịch lên men giảm xuống từ 4,4% đến 2,6% (w/v) do tác dụng ức chế của việc hấp thụ cơ chất ở áp suất thẩm thấu cao. Panchal và Stewart [130] cho rằng áp suất thẩm thấu gây ra sự ức chế này là do tăng cao nồng độ cồn nội bào ngay trong thời gian đầu lên men. Thí dụ trong trường hợp lên men với 30% sorbitol thì hầu như 100% cồn được tạo ra trong 24 giờ đầu tiên nằm ở bên trong tế bào, trong khi lên men với 15% sorbitol thì chỉ có 12% cồn bị giữ lại. Tuy nhiên ở giai đoạn cuối lên men

thì hơn 95% cồn được tiết ra môi trường không phụ thuộc vào áp suất thẩm thấu [130].

Áp suất thẩm thấu cao còn làm ngưng tạm thời khả năng hình thành khuôn lạc của tế bào nấm men [130]. Panchal và Stewart [130] cho rằng áp suất thẩm thấu cao cản trở sự khuếch tán ra môi trường ngoài của cồn được tạo ra, và vì thế sau đó gián tiếp gây ra những ảnh hưởng âm tính lên khả năng sống và lên men của tế bào. Đối với một tế bào sống thì mức 0,20 đến 0,25 x 10<sup>-4</sup>mg cồn trong tế bào chất được xem là giới hạn trên trước khi khả năng sống của nấm men bị ảnh hưởng, và người ta cho rằng khả năng sống thấp của nấm men trong sự lên men trọng lực cao (high gravity fermentations) có thể không phải do nồng độ cao của cồn bên ngoài hoặc do sự kiệt quệ của các chất dinh dưỡng cần thiết mà có thể là do ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu [130].

Vì lẽ này người ta biết rằng cồn thấm qua màng nấm men bởi sự khuếch tán thụ động [110] cho nên thật khó hình dung được nồng độ cơ chất cao có thể ảnh hưởng tới quá trình tiết cồn như thế nào. Ngoài ra khi Guijarro và Lagunas [64] sử dụng nồng độ sorbitol cao hơn nhiều đã không thấy có sự ức chế của áp suất thẩm thấu lên sự tiết cồn hoặc gây ra sự tích lũy nồng độ cao của cồn nội bào.

Trong những nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này Panchal et al. [129] đã so sánh việc sử dụng manitol và việc sử dụng sorbitol với mục đích làm tăng áp suất thẩm thấu. Người ta thấy rằng manitol còn ức chế khả năng lên men của *S. uvarum* và *S. diastaticus* mạnh hơn sorbitol nhiều. Nhưng Ziffer [175] khi nghiên cứu sự lên men 8% (w/v) glucose và hạt ngũ cốc ngâm chưa được đường hóa bởi nòi nấm men *S. cerevisiae* Y-567 đã quan sát thấy kết quả ngược lại khi so sánh ảnh hưởng của việc bổ sung manitol hoặc sorbitol từ 10% đến 40% (w/v), trong khi cả 2 chất này đều làm giảm tốc độ lên men và sự sản sinh cồn (vì làm tăng áp suất thẩm thấu) thì sorbitol gây ức chế mạnh hơn. Người ta cho rằng sorbitol ngoài việc làm tăng áp suất thẩm thấu nó còn cạnh tranh với glucose trong việc vận chuyển vào trong tế bào bởi vì một cấu trúc nó giống glucose hơn manitol [175].

Nagodawithana và Steinkraus [121] thấy rằng khi lên men dịch mật 25<sup>o</sup>P bởi nấm men *S.cerevisiae* thì cồn sớm được tích lũy tới một nồng độ cao. Cũng đã có những thông báo cho biết rằng khi nồng độ cồn tăng lên tới  $2 \times 10^{11}$  phân tử / 1 tế bào (tức là 9,08% [w/v] cồn) sẽ làm mất đáng kể khả năng sống của tế bào [149]. Áp suất thẩm thấu cũng được xem như là một nguyên nhân vì khi thêm mật theo một số gia sẽ làm tăng khả năng sống của tế bào. Thí dụ nếu như tất cả 25<sup>o</sup>P của dịch mật cô mật ngay ở thời điểm 0 thì sau 3 giờ ở 30<sup>o</sup>C khả năng sống của tế bào chỉ là 16% trong khi đó nếu như dịch mật được thêm vào theo một số gia 2,5% sau mỗi khoảng thời gian 20 phút thì khả năng sống của tế bào là 90%. Số gia càng lớn thì khả năng sống của tế bào càng nhỏ [121].

Trong lên men rượu rakê ở điều kiện phòng thí nghiệm nếu như muốn đạt được nồng độ cồn cao (20 đến 23% [v/v] cồn) trong một môi trường xác định thì việc bổ sung glucit (glucoza hoặc sacarosa) theo kiểu bậc thang cũng rất là cần thiết [58, 93, 124].

Trong lên men rượu rakê, người ta thường sử dụng nồng độ cơ chất tới 40% (w/v) để sản xuất cồn, nhưng nếu như tất cả lượng hydratcacbon này được đưa vào môi trường ngay tại thời điểm 0, thì nấm men rakê sẽ lên men với một tốc độ cực kỳ chậm chạp và một số lượng đáng kể hydratcacbon sẽ còn lại trong môi trường khi sự lên men đã dừng lại vì thế tạo ra nồng độ cồn khá thấp so với dự kiến [92].

Trong những trường hợp lên men khác thì việc bổ sung tuần tự hay bậc thang nguồn hydratcacbon cũng làm cho việc sản sinh cồn với một tốc độ nhanh hơn và đạt được một nồng độ cao hơn. Thí dụ nấm men *S.cerevisiae* trong lên men mẻ (in the batch fermentation) 38,6% (w/v) glucoza tạo ra 6,6% (w/v) cồn và tỷ lệ sống đạt 40% so với nồng độ 9,5% (w/v) cồn và tỷ lệ sống đạt 95% khi mà chỉ 25% (w/v) glucoza được đưa vào môi trường ngay ở thời điểm 0 và phần cơ chất còn lại sẽ được bổ sung vào lần lượt sau một khoảng thời gian 8 giờ [127]. Các kết quả tương tự cũng đã thu được khi lên men mà sacarosa được rót vào môi trường một cách từ từ [128]. Tương tự khi lên men mẻ 30% (w/v)

glucoza bằng vi khuẩn *Z. mobilis* IFO 13756, chúng tạo ra 12,2% (v/v) cồn trong khi độ cũng 30% glucoza này nhưng được thêm vào theo kiểu bậc thang thì chúng sẽ tạo ra 15,8% (v/v) cồn [125].

Trong lên men rượu vang đỏ, Gruess et al [43] đã thấy rằng nếu thêm dần xirô nho vào thì nồng độ cồn đạt được từ 19% đến 20% (v/v) so với nồng độ cồn cực đại đạt được là 16,6% (v/v) khi lên men mẻ. Kết quả này tương tự với kết quả của Cassy et al [41] (16,2% [v/v] cồn khi lên men mẻ với nấm men bia). Qua các thí nghiệm của mình các tác giả đều nhất trí rằng khi số gia càng nhỏ thì nồng độ cồn cuối cùng đạt được càng cao [44].

Ngoài nấm men *Saccharomyces* thì mối quan hệ qua lại này giữa nồng độ cồn và áp suất thẩm thấu trong quá trình lên men (tức là cồn có tác dụng gây độc hơn ở nồng độ cơ chất cao) cũng đã được tìm thấy ở những nấm men khác như *C. pseudotropicalis* No. 513 [118] và *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 [78]. Thí dụ những nấm men này khi lên men 20,1% (w/v) lactoza đã cho 12,5% (v/v) cồn (với gần như tất cả lactoza được lên men), nhưng khi mà nồng độ sữa được lên đến tới 35% (w/v) lactoza thì chỉ thu được 4% (v/v) cồn [78].

Vì lẽ ngày nay sự tiệt cồn từ tế bào nấm men ra môi trường ngoài được biết là không bị cản trở bởi mức áp suất thẩm thấu cao [64], cho nên cơ chế làm tăng tính độc của cồn ở các áp suất thẩm thấu cao vẫn còn là một điều bí ẩn.

Pierce và ctv. [135], Jones và ctv. [84] đã đưa ra một chiến lược công nghiệp nhằm khắc phục sự tăng tính độc của cồn ở nồng độ đường cao bằng sự lên men mẻ đầu tiên dùng nấm men chống chịu áp suất thẩm thấu để lên men tới 5-7% (w/v) cồn, sau đó bổ sung nấm men chống chịu cồn vào để tiếp tục lên men. Phương hướng như vậy đã thành công khi người ta dùng *S. bisporus* var. *mellis* ATCC 28252 như là nấm men chống chịu áp suất thẩm thấu và *S. uvarum* ATCC 26602 như là nấm men chống chịu cồn trong việc lên men 29% (w/v) sacaroza.

b. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên tính chống chịu cồn ở nấm men.

Nhiệt độ tối ưu đối với giai đoạn đầu lên men thường cao hơn nhiệt độ tối ưu đối với sinh trưởng từ  $5^{\circ}\text{C}$  đến  $10^{\circ}\text{C}$  và cả hai nhiệt độ này đều phụ thuộc vào nòi [87]. Các nòi *Saccharomyces* ưa nhiệt trung bình có nhiệt độ sinh trưởng tối ưu ở trong khoảng  $35^{\circ}\text{C}$  và nhiệt độ lên men tối ưu ở trong khoảng  $40^{\circ}\text{C}$  [100]. Tuy nhiên từ lâu người ta đã biết rằng (theo kinh nghiệm) sự cô đặc của cồn sẽ làm biến đổi mối quan hệ giữa nhiệt độ và sự sinh trưởng, cũng như giữa nhiệt độ với các đặc tính lên men và với khả năng sống của tế bào nấm men. Thí dụ người ta thấy nhiệt độ lên men cao hơn sẽ làm dùng sớm khả năng lên men và kết quả là gây ra sự lên men không hoàn toàn (tức là vào giai đoạn cuối của sự lên men còn một lượng hydratcacbon sót lại trong môi trường) và vì thế nó tạo ra một nồng độ cồn thấp hơn dự kiến [98].

Cáo nấn men dùng để sản xuất cồn thường phần cũng tạo ra nồng độ cồn thấp hơn ở nhiệt độ cao. Người ta làm bất động nòi nấm men bánh mỳ *S.cerevisiae* ATCC 7754 để dùng trong lên men glucose theo mẻ (batch glucose fermentations), nó tạo ra nồng độ cồn cực đại 14,5% (w/v) ở  $20^{\circ}\text{C}$  và 12% (w/v) ở  $30^{\circ}\text{C}$  [71]. Nòi nấm men *S.cerevisiae* STV 89 khi lên men 30% (w/v) glucose theo mẻ đã tạo ra 14% (w/v) cồn ở  $20^{\circ}\text{C}$ , 10% ở  $35^{\circ}\text{C}$  và ở  $40^{\circ}\text{C}$  chỉ đạt được 8% (w/v) cồn [141]. Các quan sát so sánh cũng đã được tiến hành với các nòi nấm men *S.cerevisiae* NSI 113 [144], *S.cerevisiae* Y-567 [176] và nòi nấm men chịu nhiệt *K. marxianus* người ta cũng thấy rằng khi lên men ở nhiệt độ cao hơn sẽ thu được nồng độ cồn thấp hơn, sự giảm hiệu suất tạo cồn là do cơ chất không được sử dụng hoàn toàn.

Người ta cũng thấy nhiệt độ cao hơn làm tăng tác dụng có hại của cồn đối với khả năng sống của tế bào nấm men. Thí dụ trong lên men dịch mật bằng nấm men *S.cerevisiae* thì khả năng sống của tập đoàn nấm men tăng lên nếu như lên men ở  $15^{\circ}\text{C}$  thay vì lên men ở  $30^{\circ}\text{C}$  [122]. Người ta cho rằng tỷ lệ sống được nâng cao là do nhiệt độ thấp hơn đã làm giảm sự tích lũy cồn nội bào. Thật vậy, ở  $30^{\circ}\text{C}$  nồng độ cồn nội bào đạt tới  $2 \times 10^{11}$  phân tử / 1 tế bào và ở  $15^{\circ}\text{C}$  chỉ là  $4 \times 10^{10}$  phân tử cồn / 1 tế bào, khi đó khả năng sống của quần thể tế bào xấp xỉ 100%. Với nấm men

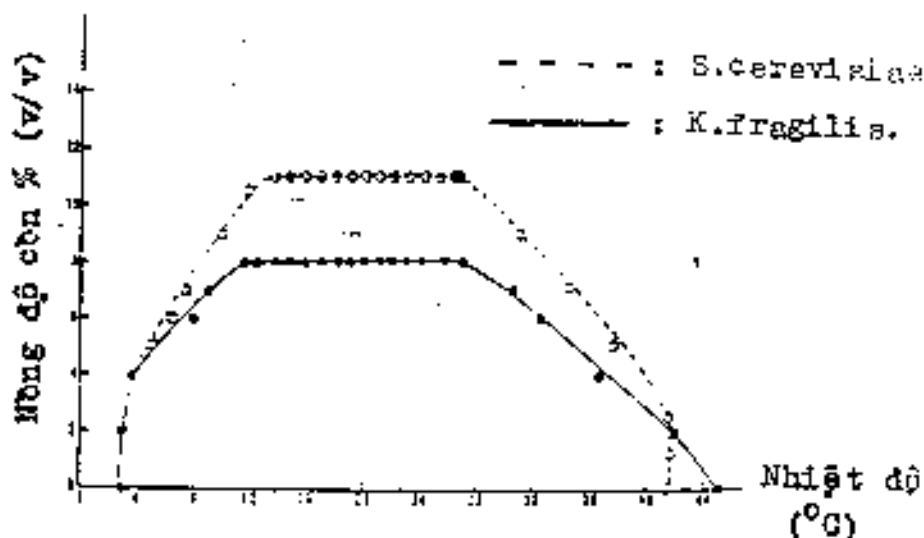
bia, Casey et al. [41] đã phát hiện thấy khi lên men 28<sup>o</sup>P mà nhiệt độ tăng từ 14<sup>o</sup>C đến 30<sup>o</sup>C thì khả năng sống của tập đoàn nấm men ở vào thời điểm cuối cùng của sự lên men giảm xuống chỉ còn 0,1%.

Ở nhiệt độ cao thì ảnh hưởng của cồn lên tốc độ sinh trưởng của nấm men cũng trở nên rõ ràng hơn. Khả năng đề kháng của nấm men với ảnh hưởng ức chế của cồn lên tốc độ sinh trưởng ở cùng một nồng độ cồn cố định sẽ giảm xuống khi nhiệt độ tăng lên. Các kết quả tương tự cũng đã thu được với các nòi nấm men dùng trong sản xuất như *S.sake*, *S.uvarum* ATCC 2602 [100], *S.cerevisiae* [36, 66, 94], *K.fragilis*, *K.marxiianus* YKL 6 và NCYC 587, *C.pseudotropicalis* YCa 9 và *S.uvarum* YSa 85 [66]. Tuy nhiên người ta thấy so với tốc độ sinh trưởng thì tốc độ lên men bền vững hơn với sự ức chế của cồn ở nhiệt độ cao. Thí dụ khi nhiệt độ tăng lên trong phạm vi từ 25<sup>o</sup>C đến 45<sup>o</sup>C thì khả năng lên men của nòi nấm men *S.cerevisiae* 5D-cyc là bền vững hơn với sự ức chế của cồn [36]. Những kết quả tương tự cũng đã thu được với *K.marxiianus* [73].

Chỉ mới rất gần đây người ta mới cố gắng xác định xem nhiệt độ đã ảnh hưởng lên khả năng tạo cồn và chống chịu cồn của nấm men theo một cơ chế như thế nào. Giống như trong trường hợp xem xét ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu, người ta cho rằng khi nhiệt độ lên men tăng lên sẽ làm tăng sự tích lũy cồn nội bào, vì thế mà ảnh hưởng ức chế của cồn trở nên rõ ràng hơn khi nhiệt độ tăng lên [120, 123]. Hiện tượng này được Navarro và Durand [123] thông báo rộng rãi vào năm 1978 với một nòi nấm men *S.cerevisiae* khi lên men 12% (w/v) sacaroza ở 10<sup>o</sup>C, 20<sup>o</sup>C và 30<sup>o</sup>C. Các tác giả thấy rằng nồng độ cồn nội bào luôn luôn vượt nồng độ cồn ngoại bào và sự khác biệt này là rõ ràng nhất vào thời điểm rất sớm của sự lên men. Khi nhiệt độ tăng lên thì nồng độ cồn nội bào tăng lên và các giá trị đỉnh tương ứng của nó ở 10, 20 và 30<sup>o</sup>C là 10, 17 và 30% (w/v) cồn. Người ta cho rằng sự tích lũy này là do kết quả của việc ngăn trở sự khuếch tán của cồn qua màng tế bào ra môi trường ngoài. Đặc biệt giá trị đỉnh của cồn nội bào xuất hiện ngay trước khi

đình sự sinh trưởng và trước khi tốc độ sinh còn giảm xuống cho nên các tác giả kết luận rằng những hiện tượng này là do tác dụng độc của cồn nội bào được tích lũy [123].

Người ta đã tìm thấy mối liên quan giữa nhiệt độ và tính chống chịu cồn, đó là ảnh hưởng của cồn lên nhiệt độ sinh trưởng cực đại, cực tiểu và tối ưu. Thí dụ nấm men rượu vang *S.cerevisiae* Montrachet UGD 522 có nhiệt độ sinh trưởng cực đại ở 37°C khi không có cồn, nhưng khi có 6% (v/v) cồn thì nhiệt độ này giảm xuống chỉ còn là 32°C [137]. Cũng vậy, Benitez et al. [30] khi nghiên cứu 632 nòi nấm men rượu vang đã thấy ở 22°C có 106 nòi có thể mọc trên môi trường YPD (cao nấm men - pepton - dextroza) có bổ sung 1% (v/v) cồn, nhưng nếu như nhiệt độ tăng lên tới 38°C thì không có một nòi nào có thể mọc được trên môi trường này. Nhiều nghiên cứu khác về vấn đề này đã được tiến hành trên các nòi nấm men *S.cerevisiae* I C 3507 [96, 142, 160] và *K. fragilis* I C 2671 [142, 143], người ta đã thí nghiệm với những nồng độ cồn cao nhất vẫn còn cho nấm men sinh trưởng được trên một phạm vi nhiệt độ từ 3°C đến 45°C [161]. Khi thí nghiệm với nấm men *S.cerevisiae*, Van Uden và cộng sự đã phát hiện thấy nhiệt độ sinh trưởng cực đại đã bắt đầu giảm xuống khi mà nồng độ cồn lớn hơn 3% (v/v) [142, 160, 161], và nhiệt độ sinh trưởng cực tiểu đã bắt đầu tăng lên khi nồng độ cồn lớn hơn 2% (v/v), cuối cùng dẫn đến một khoảng nhiệt độ từ 13°C đến 27°C mà trong khoảng đó nấm men có khả năng chống chịu với cùng một nồng độ cồn cực đại 11% (v/v) (hình 3). Nòi *K.fragilis* I C 2671 cũng cho một đồ thị tương tự về mối liên quan giữa nhiệt độ và tính chống chịu cồn (chỉ khác là nòi này chỉ có khả năng chống chịu với nồng độ cực đại 8% (v/v) cồn). Chúng ta có thể thấy rõ ý nghĩa của những kết quả này đối với sự lên men công nghiệp: khi không có cồn ở thời điểm cấy giống thì tỷ lệ sinh trưởng của nấm men sẽ vượt ra tỷ lệ chết, sau đó vì có sự tích lũy cồn trong môi trường mà nhiệt độ tối ưu và nhiệt độ cực đại đối với sự sinh trưởng sẽ sụt xuống làm cho tỷ lệ sinh trưởng và tỷ lệ chết chuyển dịch lại gần nhau. Cuối cùng nồng độ cồn có thể đạt tới điểm mà tại đó tỷ lệ chết vượt tỷ lệ sinh trưởng, khi đó sự lên men sẽ dừng lại [161].



**Hình 3** : Đường cong nhiệt độ của tính chống chịu cồn cực đại ở *S. cerevisiae* và *K. fragilis*.

Những nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc xác định xem những vị trí nào trong tế bào mà ở nhiệt độ cao sẽ trở nên mềm cộm hơn với tác dụng của cồn. Nói chung người ta đều nhất trí cho rằng màng trong ty thể là điểm bị tấn công [39, 147, 161].

Các nghiên cứu của Van Uden [161] với nấm men *S. cerevisiae* I C 3507 và các alkanol như izopropanol, propanol, butanol, ethanol đã cho thấy cả 4 alkanol này đều có khuynh hướng làm cho các cấu trúc chịu tác dụng có hại của nhiệt độ trở nên mềm cộm hơn. Những nghiên cứu sâu hơn cho thấy alkanol nào mà càng dễ hòa tan lipid thì nó càng dễ làm tăng sự mềm cộm nhiệt. Điều này cho thấy lipid của màng là một trong những vị trí chịu tác dụng có hại của alkanol cũng như của các tác nhân gây mềm cộm nhiệt khác. Do có những mối liên quan chặt chẽ giữa nhiệt độ, cồn và đột biến petite ở nấm men *Saccharomyces* mà người ta cho rằng màng trong ty thể là một vị trí đặc thù chịu tác dụng có hại của nhiệt độ, cồn. Việc xử lý nấm men *Saccharomyces* với nồng độ cồn cao hoặc nhiệt độ cao sẽ làm tăng tỷ lệ hình thành đột biến petite [39].

c. Di truyền học tính chống chịu cồn ở nấm men :

Điều đáng ngạc nhiên là người ta biết ít về di truyền học tính chống chịu cồn ở nấm men. Rõ ràng là dưới những điều kiện xác định các nòi nấm men khác nhau thì khác nhau về khả năng chống chịu cồn [48, 61, 76, 138] và tính chống chịu cồn ở mỗi nòi là dấu hiệu di truyền [61, 76, 88].

Khi xem xét sự phức tạp của các ảnh hưởng ức chế của cồn lên nấm men, các nhà nghiên cứu thấy rằng tính chống chịu cồn ở *Saccharomyces* chịu sự kiểm soát polygen. Bằng chứng trực tiếp cho vấn đề này được Imaill và Ali đưa ra [77], họ phát hiện thấy các thể phân ly nhận được từ các nòi *Saccharomyces* lưỡng bội biểu lộ một biến dị rộng về tính chống chịu cồn và không có một thể đơn bội nào vượt của mẹ về tính trạng này. Hơn nữa khi lai các nòi đơn bội có nguồn gốc khác nhau sẽ tạo ra các nòi lưỡng bội có một phạm vi rộng về tính chống chịu cồn và trong một vài trường hợp nó vượt các nòi cha mẹ về tính trạng này. Những kết quả như vậy là phù hợp với sự kiểm soát polygen, và vì thế mà cực kỳ khó khăn để tách các đột biến chống chịu cồn bằng các kỹ thuật chọn lọc thông thường [48, 63, 76, 153, 167]. Thí dụ Brown và Oliver [38] cho rằng các thủ tục cấy tách chỉ hữu ích đối với việc chọn lọc các đột biến có khả năng sống cao hơn khi có cồn vì cách chọn lọc này cho phép tách tự động các thể đột biến chống chịu cồn (vốn rất hiếm hoi) trong quần thể tế bào trên môi trường có nồng độ cồn cao, còn việc chọn lọc bằng cách cấy truyền liên tục trên các môi trường có nồng độ cồn cao hơn là không có ý nghĩa vì chúng không dẫn đến các biến đổi di truyền sâu sắc.

Tuy nhiên Alikhanyan và ctv [22] đã gây tạo được các đột biến chống chịu cồn ở *S. oviformis*, các tác giả đã xử lý tế bào với các tác nhân như diethyl sulphate hoặc với tia UV. Các đột biến phân lập được có thể mọc ở nồng độ cồn 17,5% (v/v), trong khi nòi dạng đại chỉ mọc được ở nồng độ cực đại 14,4% (v/v) cồn. de Mancilha và ctv [49] cũng đã thông báo về những đột biến chống chịu cồn, nhưng các tác giả đã không đưa ra những số liệu cho cơ sở di truyền học của tính chống chịu cồn đã được tăng lên.

Điều rất đáng quan tâm là bản thân của cũng là một tác nhân mạnh mẽ, nồng độ 24% và 30% (v/v) của cồn lên tăng tỷ lệ xuất hiện các đột biến petite ở *S. cerevisiae* lên 10 lần và 40 lần [173]. Vì trong trường hợp này các đột biến petite là gần với cồn hơn các nòi cha mẹ (đánh giá theo tỷ lệ tế bào có khả năng sống sau 1 giờ xử lý ở 24% [v/v] cồn), cho nên có thể kết luận rằng sự tăng tỷ lệ hình thành đột biến petite là kết quả của tác dụng gây đột biến chứ không phải kết quả của chọn lọc. Do các đột biến petite không có khả năng hô hấp cho nên về mặt lý thuyết chúng rất hữu ích đối với việc sản xuất cồn dưới điều kiện oxy cố áp lực thấp. Nhưng trong thực tế người ta đã thu được kết quả thấp cả về năng suất và khả năng sản sinh cồn khi dùng các đột biến petite của *S. uvarum* 5B-cyc và *S. cerevisiae* GRF 18 [37, 82]. Theo Brown và ctv [37] thì hiện suất thấp này là do các đột biến petite có sự suy giảm về tính bền vững đối với tác dụng ức chế sự sinh trưởng của cồn. Tuy vậy Moulin và ctv [117] lại phát hiện thấy ở *C. pseudotropicalis* thì các đột biến petite là chống chịu cồn hơn dạng đại và được xem là hữu ích hơn đối với việc sản xuất cồn dưới những điều kiện gần như kỵ khí.

Ngày 1983 người ta đã đưa ra hai kiểu phenotyp có thể xem như là biểu thị cho các dấu chuẩn di truyền đối với tính chống chịu cồn ở nấm men *Saccharomyces*. Thứ nhất, Sugden và Oliver [155] đã so sánh tính chống chịu cồn của nấm men *S. cerevisiae* kiểu đại với một nòi hình thành từ chính nòi này nhưng bị hư hỏng về cả 3 proteaza không bào chủ yếu (đột biến pep 4.3). Ở 25°C, sự ức chế của cồn từ 0 đến 8% (w/v) đối với sự sinh trưởng của 2 nòi nấm men này là như nhau. Nhưng trong khoảng 30°C đến 38°C thì cùng một nồng độ cồn đã gây ra sự ức chế mạnh hơn đối với sự sinh trưởng của thể đột biến pep 4.3. Người ta suy đoán rằng thể đột biến pep 4.3 là hậu quả của những thay đổi gen bản trong màng và khi nấm men có màng bị biến đổi như vậy thì tính chống chịu cồn bị giảm xuống. Thứ hai, người ta xem xét mối liên quan giữa tính chống chịu cồn và các protein sốc nhiệt. Các protein này được Plesset et al. tìm thấy lần đầu tiên [134]. Khi nghiên cứu với nấm men *S. cerevisiae* ATCC 26422, nấm men sake, Watson và Cavicchioli [165] đã thấy sau khi xử lý 36 giờ ở

24.0 (w/v) còn thì nòi nấm men có protein sốc nhiệt có tỷ lệ sống sót là 40% trong khi cũng nòi này nhưng không có protein sốc nhiệt thì tỷ lệ sống sót là 0%. Gáo nòi có protein sốc nhiệt cũng có khả năng hồi phục sự sinh trưởng tốt hơn khi đã loại bỏ cồn. Kết quả tương tự cũng đã thu được ở các nòi *S.cerevisiae* CBS 1171, 1237, 1242 và *S.cerevisiae* ATCC 2642 [46]. Do có những kết quả nghiên cứu như vậy mà người ta cho rằng việc tạo dòng những gen sản sinh ra các protein sốc nhiệt và đưa chúng vào trong nấm men có thể là một trong những cách làm tăng tính chống chịu cồn của nấm men.

Ở Việt Nam từ trước đến nay chưa có nhiều nghiên cứu về di truyền học tính chống chịu cồn ở nấm men. Khi tiến hành điều tra nòi nấm men *S.cerevisiae* TH-30 [1] các nhà nghiên cứu thấy rằng tính chống chịu cồn ở nòi nấm men này có thể do các gen nằm trong tế bào chất quy định.

## 2. Tính chống chịu nhiệt.

### a. Một số vấn đề về tính chịu nhiệt ở sinh vật :

Khi nói về sự sống người ta thường có cách nhìn quá hẹp về khái niệm của môi trường. Nếu như quá nóng, quá lạnh, quá ẩm, quá khô hay quá mặn thì con người không thể tồn tại được. Thế nhưng trong tất cả các môi trường cực đoan nói trên vẫn có một số sinh vật sống sót và phát triển [35]. Môi trường ở nhiệt độ cao là một trong những kiểu môi trường cực đoan và cũng là một trong những hướng nghiên cứu hấp dẫn nhất. Thật vậy nhiệt độ là một trong những thông số quan trọng nhất ảnh hưởng tới hoạt động của tế bào và sự tiến hóa của sinh vật [35]. Bất kỳ một sinh vật đa bào nào cũng không thể sống được ở nhiệt độ lớn hơn 50°C, đó là giới hạn mà chỉ một số rêu, một vài bọ côn trùng, giáp xác đạt được. Giới hạn trên đối với các sinh vật nhân chuẩn hình như nằm ở khoảng 60°C, một số ít protozoa, tảo và nấm có thể sống ở các nhiệt độ như vậy. Những sinh vật sống ở nhiệt độ lớn hơn 60°C được gọi là sinh vật ưa nhiệt và chỉ có bọ nhạn sơ (các vi khuẩn) là có thể sống và phát triển được ở nhiệt độ này. Tuy nhiên trong số các sinh vật nhân sơ thì cũng chỉ có một số ít chi là có đại diện trong những sinh

cao hơn  $60^{\circ}\text{C}$ . Các sinh vật nhân chuẩn có cấu trúc cơ thể phức tạp hơn do đó không phù hợp với sự sống ở nhiệt độ quá cao vì thế mà chúng có khu hệ phân bố hẹp hơn  $[^{-35}]$ . Một số vi khuẩn sống ở nhiệt độ cao không phải chỉ đơn thuần là ưa nhiệt mà còn ưa cả axit, chúng có thể sống trong môi trường có pH thấp (pH = 3). Loại vi khuẩn ưa nhiệt nhất (Pyrodictium) đã được K.O. Stetter phân lập vào năm 1982 từ một nguồn nhiệt dưới biển có thể sinh trưởng ở nhiệt độ  $110^{\circ}\text{C}$   $[^{-150}]$ . R.H. White khi nghiên cứu sự thủy phân các liên kết peptit ở  $250^{\circ}\text{C}$  thấy rằng một phân tử protein có trọng lượng phân tử 48000 sẽ có thời gian bán hủy là 1,08 giây, còn khi xem xét sự thủy phân các liên kết cộng hóa trị dọc theo một phân tử ADN, các tính toán cho thấy ở  $250^{\circ}\text{C}$  phân tử ADN của tế bào vi khuẩn E.coli có thời gian bán hủy trong khoảng từ 19,3 micro giây đến 3,5 mili giây. Như vậy  $250^{\circ}\text{C}$  là quá nóng đối với sự sống  $[^{-168}]$ .

Từ lâu người ta đã đặt câu hỏi là bằng cách nào các cơ thể ưa nhiệt có thể sống sót trong các điều kiện mà đại bộ phận các sinh vật khác bị đảo thái. Khi người ta biết rằng chỉ một sự thương tổn đơn giản trong cấu trúc màng của tế bào sẽ kéo theo sự hư hỏng của các cấu tử khác và làm cho tế bào chết thì rõ ràng là tính bền nhiệt của màng tế bào là một trong những điều kiện thiết yếu bậc nhất cho cơ thể có thể sống được ở nhiệt độ cao. Màng tế bào động vật và màng tế bào của các sinh vật khác không ưa nhiệt nhanh chóng bị phá hủy khi nhiệt độ tăng cao, thí dụ tế bào hồng cầu bị nhiệt phân ở  $50^{\circ}\text{C}$ ; ngược lại khi bị xử lý ở nhiệt độ khá cao thì màng tế bào của các vi sinh vật ưa nhiệt vẫn chưa bị ảnh hưởng gì. Vấn đề đặt ra là cơ sở phân tử của tính nhạy cảm với nhiệt độ của màng là gì? Như người ta đã biết màng tế bào của bọn sinh vật nhân chuẩn và bọn eubacteria có cấu trúc gồm một lớp lipid kép xen vào đó là các protein. Các lipid của màng có một phần kỵ nước, nó được hướng vào trung tâm của hai lớp, còn đầu ưa nước lại quay ra phía ngoài vì vậy mà các bề mặt của màng tiếp xúc với nước, trong khi đó phần giữa lại nghèo nước. Theo một mô hình do S.J. Singer và G.L. Nicolson đề xuất vào năm 1972 thì cấu trúc sinh học tạo nên một chất nền kiểu tinh thể lỏng trong đó các lipid và protein

có thể xếp xếp bên cạnh nhau. Tuy nhiên khi lớp lipit kép bị đốt nóng thì các vùng kỵ nước trở nên dễ bị biến đổi hơn và bắt đầu tách khỏi nhau. Khi nhiệt độ tiếp tục tăng đến một giới hạn nào đó thì các phân tử tách khỏi nhau hoàn toàn và cấu trúc của màng bị phá vỡ [34]. Người ta đã biết rằng thành phần các axit béo của các lipit cấu trúc lên màng quyết định tính nhạy cảm của màng đối với nhiệt độ. Ở trong màng các axit béo không no là tự do hơn nhiều, điều đó làm cho chúng nhạy cảm hơn đối với các ảnh hưởng của nhiệt độ bởi chúng ít chịu sự kiềm tỏa về mặt cấu hình trong phần cấu trúc. Tính chất dễ bị hóa nước này của các axit béo không no dưới ảnh hưởng của nhiệt độ giải thích tại sao một số mỡ lại ở dạng lỏng ở nhiệt độ môi trường, trong khi cùng điều kiện đó nhưng một số mỡ giàu axit béo no lại ở dạng rắn. Axit béo trong màng càng no thì nhiệt độ nóng chảy của màng càng cao. Thật vậy, ở các vi khuẩn ưa nhiệt thì tỷ lệ axit béo no trong màng tăng lên [54], tính chất này cho phép hiển tại sao các vi sinh vật ưa nhiệt bắt buộc lại không thể sinh trưởng ở các nhiệt độ dưới 35 - 40°C. Còn ở các vi khuẩn cổ sinh thì màng của chúng không cấu tạo theo mô hình hai lớp lipit, theo nhóm nghiên cứu của M. de Rosa thì nó chỉ bao gồm một lớp lipit [51].

Ngoài các màng sinh học, tế bào sống còn bao gồm các đại phân tử cơ bản (protein, các axit nucleic...), tính bền và hoạt động chức năng của chúng phụ thuộc vào cấu hình phân tử, tức là phụ thuộc vào cách xếp xếp của các phân tử trong không gian. Các protein và các axit nucleic được duy trì trong một cấu hình đặc trưng và chỉ theo cấu hình riêng đó thì chúng mới có hoạt động chức năng.

Cho đến nay có hai lý thuyết đối lập nhau về việc giải thích sự hoạt động của các protein ở các sinh vật ưa nhiệt. Thuyết thứ nhất cho rằng các protein ở các sinh vật ưa nhiệt có lẽ cũng bền bền như các protein tương ứng ở các sinh vật không ưa nhiệt, nhưng tốc độ tái tạo của chúng lớn hơn rất nhiều. Giả thuyết này không được quan tâm nữa từ khi người ta phát hiện thấy các sinh vật ưa nhiệt đòi hỏi một nhiệt độ cực tiểu cho sự sinh trưởng mà nhiệt độ này thường cao hơn nhiệt độ tối ưu

của các sinh vật không ưa nhiệt, ~~và các protein của các sinh vật không ưa nhiệt~~ và các protein của các sinh vật ưa nhiệt không bị biến tính ở các nhiệt độ gây biến tính thông thường. Thuyết thứ hai đề cập đến sự tồn tại của các nhân-tổ làm bền nhiệt đối với cấu trúc không gian ba chiều của các đại phân tử thì lại được nhiều ý kiến ủng hộ [50, 132].

Vì cấu hình của các axit nucleic cũng duy trì bởi các tương tác năng lượng thấp nên tính bền của chúng cũng bị ảnh hưởng mạnh bởi nhiệt độ. Phân tử ADN là một chuỗi xoắn kép gồm hai mạch đơn liên kết với nhau nhờ những mối liên kết hydro, các liên kết yếu này quyết định sự tạo thành chuỗi xoắn kép và độ bền của nó. Khi bị đun nóng các liên kết hydro bị phá hủy, hai mạch sẽ tách nhau ra, phân tử ADN không còn ở dạng cấu hình hoạt động nữa và không còn khả năng truyền đạt thông tin di truyền. Sự toàn vẹn của phân tử cơ bản này được bảo vệ như thế nào ở các cơ thể ưa nhiệt? Trước hết nó được tăng cường nhờ sự hình thành bổ sung các liên kết yếu giữa hai mạch. Thực vậy trong khi các bazơ A và T chỉ tạo với nhau hai liên kết hydro thì các bazơ G và X lại tạo với nhau ba liên kết hydro. Vì vậy tỷ lệ các bazơ G và X của cả hai mạch sẽ làm thay đổi nhiệt độ phân ly của phân tử ADN. Người ta thấy khi tỷ lệ bazơ G và X tăng lên 1% thì nhiệt độ phân ly tăng lên  $0,41^{\circ}\text{C}$ .

Bên cạnh sự thích ứng nhờ việc cải biến thành phần bazơ còn có một cách làm bền khác liên quan đến các nhân tố bên ngoài. Các axit nucleic có thể được làm bền khi có các muối kim loại như  $\text{Ca}^{++}$  hay  $\text{Mg}^{++}$  (tức là các cation hóa trị hai). Dịch huyền phù ADN trong môi trường có nồng độ cation hóa trị hai đủ cao sẽ không bị biến tính khi nó bị đun nóng đến nhiệt độ phân ly. Điều này có ý nghĩa ở chỗ nếu như tế bào có khả năng duy trì được các nồng độ cation hóa trị hai nội bào đủ lớn thì các axit nucleic sẽ bền ở nhiệt độ cao. Theo nhóm nghiên cứu của T. Oshima ở Viện công nghệ Tokyo (Nhật Bản) [126] thì cơ chế mà tế bào sử dụng để làm bền các axit nucleic là sản sinh ra các bazơ hữu cơ được gọi là các polyamin (thermin và thermospermin), chúng hoạt động như các cation hóa trị hai và có tác dụng làm

bền các axit nucleic. Tuy vậy để cho quá trình này có hiệu quả thì điều cần thiết là hàm lượng của các cation hóa trị hai hay của các polyanion phải duy trì ở mức khá cao. Khi nghiên cứu thành phần của một loại ARN vận chuyển đặc hiệu cho một axit amin ở *Thermus thermophilus*, N.Horio thấy sự thay thế một bazơ (ribotimín được thay thế bằng 2-thioribotimín) đã làm tăng tính bền nhiệt của phân tử lên  $3^{\circ}\text{C}$  [72].

Việc nghiên cứu sự thích nghi vi trong tính thích nghi phân tử ở các sinh vật ưa nhiệt sẽ giúp giải quyết vấn đề nguồn gốc của các sinh vật này. Câu tập từ hơn 100 năm nay câu hỏi về nguồn gốc của các vi sinh vật ưa nhiệt làm cho các nhà khoa học đau khổ. Có hai giả thuyết lớn đã được đề xuất: giả thuyết thứ nhất cho rằng sự sống đã xuất hiện từ chỗ rất nóng vì thế mà các vi sinh vật đầu tiên là các vi sinh vật ưa nhiệt nguyên thủy, giả thuyết thứ hai cho rằng các sinh vật ban đầu sống ở các nhiệt độ bình thường và các sinh vật ưa nhiệt bắt nguồn từ các sinh vật không ưa nhiệt hay từ các sinh vật ưa nhiệt trung bình.

Do không biết được nhiệt độ của trái đất tại thời điểm xuất hiện các sinh vật nguyên thủy, nên không thể khẳng định được sự đúng đắn của giả thuyết thứ nhất. Tuy nhiên, điều dễ hình dung là nếu như các sinh vật đầu tiên là ưa nhiệt thì các sinh vật thích nghi với các nhiệt độ thông thường phải bắt nguồn từ các sinh vật ưa nhiệt nhờ sự tích lũy các biến đổi di truyền (các đột biến). Các đột biến liên quan với nhiệt đã được biết rõ trong đại bộ phận các hệ thống sống [35]. Những đột biến liên quan với nhiệt như vậy có lẽ đã xuất hiện do một vài biến đổi trong các gen ở các sinh vật ưa nhiệt dẫn đến sự biến đổi trong các protein. Sự thay thế một axit amin làm bền nhiệt này bằng một axit amin không làm bền nhiệt khác sẽ dẫn tới sự thay đổi về cấu hình của phân tử protein và kết quả làm cho phân tử protein bị cải biến sâu sắc và trở nên liên quan với nhiệt. Tóm lại các sinh vật thích nghi với các nhiệt độ thông thường có thể bắt nguồn từ những sinh vật ưa nhiệt do sự tích lũy những đột biến như vậy.

Ngược lại thật khó hình dung quá trình tiến hóa của các sinh vật ưa nhiệt từ các sinh vật ưa nhiệt trung bình đã xảy ra như thế nào? Tất cả các đại phân tử của những sinh vật ưa nhiệt đều bền ở nhiệt độ cao, vì vậy sự biến đổi di truyền cần phải xảy ra ở mỗi gen, mỗi protein và tất cả những biến đổi di truyền này phải diễn ra trước khi sinh vật rơi vào điều kiện nhiệt độ cao để đảm bảo cho sinh vật tồn tại và phát triển được trong điều kiện môi trường mới. Những đột biến này tạo điều kiện thuận lợi cho những sinh vật mang chúng dưới áp lực chọn lọc của môi trường có nhiệt độ cao.

Vậy nên điều hợp lý là người ta cho rằng các sinh vật ưa nhiệt đã xuất hiện đầu tiên.

Nhân tố cơ bản xác định các giới hạn nhiệt độ cho sự phát triển của sinh vật chính là cấu trúc di truyền của nó và mặc dù vai trò của các gen trong việc xác định các giới hạn này đã được thừa nhận nhưng cho đến nay người ta chưa biết chính xác bản chất di truyền học của tính chống chịu nhiệt. Vì vậy mà các nghiên cứu về tính trạng này được tập trung vào việc xác định cơ sở sinh lý học của nó. Người ta đã thống kê được 25 giả thiết nêu ra để giải thích sự bền vững với nhiệt độ cao. Trong đó có 4 vấn đề chính: Thứ nhất, người ta cho rằng sự sinh trưởng ở nhiệt độ cao là do quá trình trao đổi chất tích cực hơn để thay thế các chất trao đổi kém bền nhiệt. Thứ hai, tại nhiệt độ cao các lipit chứa các axit béo no sẽ có điểm nóng chảy cao hơn các lipit chứa các axit béo không no, vì thế mà các sinh vật mang nhiều axit béo no sẽ có khả năng bảo toàn được tính nguyên vẹn của tế bào ở nhiệt độ cao. Thứ ba, các sinh vật chịu nhiệt có khả năng sinh ra các đại phân tử cần thiết như các enzym và các protein có thể tồn tại được ở nhiệt độ cao và cuối cùng là các sinh vật chịu nhiệt chứa các cấu trúc hoặc các cơ quan tử vẫn có thể duy trì được hoạt động chức năng ở nhiệt độ cao. Tuy nhiên gần đây cũng đã có một số dẫn liệu về di truyền học tính chống chịu nhiệt, người ta đã chứng minh rằng khả năng sống được của nấm men ở nhiệt độ cao ( $45^{\circ}\text{C} - 46^{\circ}\text{C}$ ) là phụ thuộc vào hệ gen ty thể [79], đồng thời cũng đã có những dẫn liệu chứng tỏ rằng ở nấm men tính chịu nhiệt ( $42^{\circ}\text{C}$ ) là do các gen trên

nhằm xác thể quy định [1, 8, 9].

Về phương diện sản xuất công nghiệp các sinh vật ưa nhiệt quan hệ đến công nghệ sinh học bởi ít nhất hai lí do. Thứ nhất, khả năng tồn tại và phát triển được của các sinh vật ưa nhiệt, cũng như tính bền của các hợp phần tế bào ở điều kiện nhiệt độ cao rõ ràng là có một lợi ích lớn, ở góc độ này khả năng thái vị nhất của các sinh vật ưa nhiệt là so với các sinh vật bình thường chúng có thể tạo ra những enzym có hoạt động chức năng ở các nhiệt độ cao hơn một cách rõ rệt. Hơn nữa chính ngay ở các nhiệt độ bình thường các enzym ưa nhiệt lại bền hơn các enzym không ưa nhiệt, điều đó cho phép kéo dài thời gian sống của chúng. Mặt khác sự tăng tính bền nhiệt của các enzym không những làm cho chúng bền vững hơn đối với nhiệt mà còn bền vững hơn đối với cả những nhân tố gây biến tính khác (thí dụ như dodecyl, sunfatatri, ure, hypochloroguanidin, v.v...), với các dung môi hữu cơ và với các enzym phân giải protein. Thứ hai, chính ở góc độ của công nghệ sinh học sự thích nghi với nhiệt độ cao tạo ra nhiều thuận lợi. Sự tăng nhiệt độ sẽ cải tiến các thông số lí hóa của nước, làm tăng tỷ lệ khuếch tán và độ hòa tan của các hợp phần không ở thể khí. Độ hòa tan thường là một yếu tố hạn chế sự biến đổi sinh học các cơ chất chứa cacbon như cacbohydro, các hợp chất thơm hay các polyme glucit. Mặt khác sự tăng nhiệt độ làm giảm độ nhớt và sức căng bề mặt của nước, điều này làm cho các quá trình lên men vi sinh vật có hiệu quả hơn. Do có sự tăng tỷ lệ khuếch tán của cơ chất, sự giảm độ nhớt của môi trường nên năng lượng dùng để làm đồng thể hóa môi trường sẽ tiêu tốn ít hơn. Hơn nữa sự làm nhiễm bẩn môi trường do các thực khuẩn thể hay các vi khuẩn ký sinh thường ít được quan sát thấy ở các quá trình lên men tiến hành ở nhiệt độ cao, do loại vi sinh vật chịu được nhiệt độ cao thường không nhiều [35].

Sự tăng nhiệt độ cũng làm giảm độ hòa tan của các hợp chất bay hơi (oxy, hydro, metan, ...), thí dụ tỷ lệ oxy hòa tan trong nước ở 70°C chỉ bằng 5% ở 20°C. Vì vậy trong công nghiệp các tiến trình hoạt động không cần oxy (kỵ khí) sẽ thích hợp ở nhiệt độ cao, ngược lại các quá trình hiếu khí sẽ xảy ra khó khăn hơn.

Trong các quá trình lên men tiến hành ở mức độ công nghiệp

việc dùng các sinh vật ưa nhiệt cũng làm cho một số quy trình trở nên khả dĩ hơn do ở nhiệt độ cao độ nhớt của môi trường giảm xuống, độ hòa tan của các hợp chất không bay hơi tăng lên, việc bù đắp các chất xúc tác và nguồn cơ chất dễ dàng hơn. Hơn nữa nếu nhiệt độ tăng khá cao sẽ tạo thuận lợi chung cất các sản phẩm dễ bay hơi, chúng có thể ức chế sự sinh trưởng của tế bào hoặc để thu nhận chính các sản phẩm đó như trong trường hợp sản xuất cồn. Mặt khác các hoạt động trao đổi chất kéo theo sự tạo nhiệt mà lượng nhiệt này có thể cần phải giải tỏa bớt trong trường hợp dùng các vi sinh vật nhạy với nhiệt, trong khi đó nếu lên men bằng vi sinh vật chịu nhiệt thì không cần thiết phải làm nguội, điều này góp phần tiết kiệm năng lượng và giảm bớt phí tổn cho quá trình. Ngoài ra nhiệt độ cao sẽ làm tăng tốc độ của các phản ứng enzym [35].

b. Sốc nhiệt - sự tổng hợp protein sốc nhiệt như là một biểu hiện của tính chống chịu nhiệt ở sinh vật.

Những loài phân hướng rộng lớn của động vật, thực vật, nấm và vi khuẩn phản ứng với việc xử lý nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tối ưu bằng cách tăng cường tổng hợp nhiều protein thông thường và tổng hợp một vài protein khác biệt với một số lượng lớn [24, 25, 32, 42, 65, 91, 111, 170]. Hầu hết các dạng điển hình trong các protein này được gìn giữ một cách đặc biệt trong suốt quá trình tiến hóa [90]. Phản ứng với nhiệt độ cao này là thuận nghịch kèm theo sự phục hồi liên quan đến việc sửa chữa kiểu thông thường quá trình tổng hợp protein [52, 111]. Những protein sốc nhiệt có tác dụng rõ ràng trong việc bảo vệ tế bào chống lại tác dụng gây chết khi tế bào tiếp tục bị xử lý với nhiệt độ cao hơn [102, 112]. Ở *Drosophila melanogaster* [53] và *Saccharomyces cerevisiae* [113] việc tổng hợp protein sốc nhiệt còn cần thiết cho sự khôi phục kiểu tổng hợp protein thông thường trong thời kỳ phục hồi.

Phản ứng sốc nhiệt là một hệ thống thực nghiệm, nó cung cấp những thông tin hữu ích về những cơ chế ở mức tế bào đối với việc điều hòa sự biểu hiện của gen ở mức phiên mã. Ở tất cả những sinh vật được kiểm tra thì việc xử lý với nhiệt độ cao

đã gây ra một thay đổi nhanh chóng và đột ngột trong kiểu biểu hiện của gen do cơ chế làm ngừng lại sự phiên mã đang xảy ra và bắt đầu một sự phiên mã mới [24], hơn nữa trong khi gây ra phản ứng sốc nhiệt thì sự dịch mã của ARN thông tin bình thường bị cắt đứt. Ở *Drosophila* [27, 106, 148] và ở tế bào HeLa [70] những ARN thông tin bình thường được bảo tồn dưới dạng bị khử hoạt tính trong thời kỳ sốc nhiệt và được sử dụng lại để tổng hợp protein bình thường trong thời kỳ phục hồi. Ngược lại ở *S. cerevisiae* thì ARN thông tin cố trước khi sốc nhiệt bị hủy hoại nhanh chóng và sự phục hồi đòi hỏi một sự phiên mã mới đối với các ARN thông tin này [91, 113].

Khi xử lý với nhiệt độ cao *Neurospora crassa* phản ứng bằng cách biến đổi đột ngột sự tổng hợp protein. Ở 45°C 3 protein có trọng lượng phân tử cao (67000, 83000 và 98000) được tổng hợp mạnh mẽ. Các protein này về kích thước tương tự với những protein sốc nhiệt tìm thấy ở *Drosophila* [24, 29] HeLa [96, 166], gà [90], nấm men [57, 74], cũng như ở nhiều sinh vật khác, chúng có trọng lượng phân tử từ 70.000 đến 90000. Ở *Neurospora crassa* sự tổng hợp các protein sốc nhiệt xảy ra đồng thời với việc giảm sút sự tổng hợp các protein bình thường. Kapoor [89] đã thấy sau 12 giờ xử lý với nhiệt độ tăng cao các tế bào sợi nấm của *N. crassa* đã tổng hợp nên 5 protein sốc nhiệt lớn. Grange và ctv [60] cũng quan sát thấy các bào tử dính ở *N. crassa* đã được xử lý nhiệt tổng hợp nên 6 protein sốc nhiệt. Phản ứng tổng hợp các protein sốc nhiệt là tạm thời, sau đó sự tổng hợp protein bình thường được khôi phục lại [91, 97, 107, 111, 113, 114, 171]. Ở *N. crassa* sự tổng hợp các protein sốc nhiệt xảy ra khi xử lý nhiệt trong phạm vi từ 40°C đến 47°C nhưng phản ứng xảy ra cực đại ở 45°C. Phạm vi thay đổi chỉ 1°C đã gây ra một khác biệt lớn về số lượng các protein được tổng hợp và kiểu tổng hợp protein, tuy nhiên sự khác biệt này không phản ánh mức độ sống sót ở các nhiệt độ khác nhau (thí dụ sự tổng hợp protein được tổng hợp ở 45°C nhưng độ sống sót của tế bào ở 2 nhiệt độ này là như nhau và ở 47°C thì độ sống sót của tế bào chỉ thấp hơn một ít so với ở 45°C nhưng tỷ lệ tổng hợp protein sốc nhiệt lại thấp hơn 5%, tuy nhiên ở 47°C sự tổng hợp protein sốc nhiệt xảy ra trong một khoảng thời gian dài hơn. Ở 49°C có một mối liên quan giữa sự giảm đột ngột của độ sống sót

và sự ngưng tổng hợp protein sốc nhiệt. Các kết quả này cho thấy chỉ cần một mức độ thấp của protein sốc nhiệt cũng có thể đủ để giúp tế bào chống lại tác dụng cố hại của nhiệt độ cao. Ngoài ra các tác giả còn thấy tế bào *N. crassa* đã được xử lý trước ở 45°C sẽ tăng sức chống chịu khi bị xử lý ở 50°C (thể hiện ở độ sống sót tăng lên), nhưng tác dụng bảo vệ này không còn nữa khi sự tổng hợp protein bị ức chế bởi cycloheximide. Điều này cho thấy các protein được tổng hợp trong thời kỳ sốc nhiệt cần thiết cho tế bào chống lại các tác dụng cố hại ở những nhiệt độ cao hơn. Khi tiến hành thí nghiệm với các tế bào hồng cầu của chuột đồng Trung Quốc [102], các tế bào của các mô nuôi cấy của *Drosophila* [105, 115, 133] và các tế bào nấm men *S. cerevisiae* [112] các tác giả cũng đã thấy rằng các protein sốc nhiệt làm tăng tính chống chịu nhiệt và việc ức chế sự tổng hợp các protein sốc nhiệt sẽ làm cho tế bào mất khả năng chống chịu khi bị xử lý ở những nhiệt độ cao hơn. Cũng để bảo vệ tế bào khỏi sự hủy hoại của nhiệt, một vài protein sốc nhiệt có thể có vai trò điều hòa trong sự biểu hiện của gen.

Việc xác định vị trí của các protein sốc nhiệt bên trong tế bào có thể góp phần làm sáng tỏ chức năng của chúng. Các protein sốc nhiệt có trọng lượng phân tử 70000 của *Drosophila* [23, 163] và các tế bào động vật [166] đã được tìm thấy ở trong nhân cũng như ở trong tế bào chất. Người ta cũng đã thấy trong khi xử lý nhiệt các protein sốc nhiệt liên kết với hạch nhân [23, 131, 166] và với ARN [91]. Trong khi gây ra phản ứng sốc nhiệt người ta cũng đã tìm thấy một vài protein sốc nhiệt có trọng lượng phân tử thấp (22000 đến 32000) ở trong nhân của tế bào *Dictyostelium* [108], *Drosophila* [23]. Ở những sinh vật này các protein sốc nhiệt có trọng lượng phân tử từ 30000 đến 90000 xuất hiện trong tế bào chất không nhiều. Các nghiên cứu ở *Drosophila* cho thấy protein sốc nhiệt (được đánh dấu phóng xạ) rất ít khi liên kết với ty thể [23, 164], tuy nhiên người ta thấy ở *N. crassa* 3 protein sốc nhiệt có trọng lượng phân tử thấp liên kết với ty thể, và hiện tượng này cũng quan sát thấy ở hạt đậu trong nảy mầm [103].

Ở *N. crassa* người ta vẫn chưa biết số phận của ARN thông

tin bình thường như thế nào khi mà ARN thông tin mã hóa cho các protein sốc nhiệt đang được dịch mã. Các ARN thông tin bình thường này có thể được bảo tồn trong khi gây sốc nhiệt để biểu hiện muộn hơn trong thời kỳ phục hồi như là ở tế bào của *Drosophila*, hoặc là chúng có thể bị hủy hoại nhanh chóng như là ở *S. cerevisiae*. Người ta đã thấy trong thời kỳ sốc nhiệt ở các tế bào *Drosophila* ARN của ty thể tiếp tục được tổng hợp trong khi đó thì ty thể của *N. crassa* lại không tổng hợp các protein thông thường.

Các dữ liệu trên đây cho thấy khi bị xử lý ở nhiệt độ cao thì trong tế bào của nhiều loài sinh vật đã xảy ra một quá trình sinh tổng hợp protein sốc nhiệt đặc trưng. Các protein này có vai trò bảo vệ tế bào chống lại các tác dụng hủy hoại của nhiệt độ cao. Quá trình này được điều khiển bởi các gen nhân và có thể bởi cả các gen tế bào chất.

Tuy vậy cho đến nay vẫn chưa có được một ý kiến thống nhất về vai trò của các protein sốc nhiệt đối với việc làm tăng tính chống chịu nhiệt ở sinh vật. Một số tác giả cho rằng các protein sốc nhiệt có phân tử lượng cao có vai trò làm tăng tính chống chịu nhiệt, một số tác giả khác lại cho rằng các protein sốc nhiệt có phân tử lượng nhỏ có vai trò này, trong khi đó một vài tác giả lại cho rằng các protein sốc nhiệt không có vai trò gì trong việc làm tăng tính chống chịu nhiệt. Bằng chứng của kết luận sau cùng là khi người ta dùng cycloheximide để ức chế sự tổng hợp protein sốc nhiệt thì đã không làm giảm tính chịu nhiệt.

Mặc dù vậy các protein sốc nhiệt đã có trong tế bào có thể tạo điều kiện cho việc đặt một nền tảng cơ sở cho tính chống chịu nhiệt. Tính chống chịu nhiệt tăng lên sau lần xử lý nhiệt thứ nhất chắc chắn phải là do một vài nhân tố đã được tế bào tổng hợp. William Welch và Lee Mizzen (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) đã thấy cycloheximide không ngăn trở sự tăng tiến của tính chống chịu nhiệt là do bằng một cách nào đó nó đã làm bền một phức hệ có tên gọi là polysomes, phức hệ này có tác dụng chống lại sự hủy hoại do nhiệt độ gây ra. Sau khi gây sốc nhiệt phức hệ polysomes có vai trò chính yếu trong việc khôi phục sự tổng hợp các protein thông thường.

Giữa tính chống chịu nhiệt và các protein sốc nhiệt có thể có một mối quan hệ tính vi. Người ta đã thấy sau phản ứng sốc nhiệt các protein sốc nhiệt di chuyển tới nhân, đồng thời chúng cũng còn liên kết với các cấu tử của mạng lưới nội chất. Như mọi người đã biết mạng lưới nội chất có chức năng quan trọng trong hầu hết các sự kiện tế bào, nó có vai trò bảo vệ và điều chỉnh các hoạt động sống của tế bào và gần đây người ta mới biết rằng sự bền vững của cấu trúc này là một nhân tố quan trọng làm tăng tính chống chịu nhiệt [159].

### 3. Vai trò của hệ gen ty thể đối với tính chống chịu cồn và chống chịu nhiệt ở nấm men:

Khác với những sinh vật nhân chuẩn khác, ở *Saccharomyces* hệ gen ty thể không nhất thiết phải có, điều này thể hiện ở một số đột biến thiếu ngưng hô hấp ( $\rho^-$ ) của *S. cerevisiae* xuất hiện một cách ngẫu nhiên với tần số khá cao [53] và các đột biến như vậy dưới các điều kiện nuôi cấy thích hợp sẽ sinh trưởng và sống sót tốt gần như các nòi  $\rho^+$ . Tuy nhiên ở các tế bào nấm men hệ gen ty thể có thể đóng một vai trò quan trọng trong tính chống chịu cồn. Đối với hệ gen ty thể của nấm men cồn là một tác nhân mạnh, với nồng độ 24% (v/v) cồn thì tần số đột biến  $\rho^-$  ở *S. cerevisiae* tăng lên 10 lần [28]. Cả hai loại đột biến  $\rho^-$  ngẫu nhiên và  $\rho^-$  gây tạo bởi cồn đều không thể tái sinh khả năng hô hấp của chúng được, bởi lẽ những đột biến như vậy là hậu quả của sự sai hỏng trong hệ gen ty thể [174]. Vì lẽ ấy mà khi có mặt của cồn sẽ có một ưu thế chọn lọc đối với các tế bào  $\rho^+$ , tính chất này cũng đã được sử dụng như là một phương pháp để thu nhận nòi lại ở nấm men [17]. Ở nấm men *S. cerevisiae* các đột biến  $\rho^-$  so với các nòi cha mẹ  $\rho^+$  của chúng thì mẫn cảm với cồn hơn, cả về sự sinh trưởng cũng như độ sống sót [20, 28].

Nhiệt độ cao và nồng độ gây ức chế của cồn có tác dụng gây chết đối với tế bào nấm men và người ta cho rằng các nhân tố này tác động lên ty thể [79]. So với các nòi nấm men đang trong phòng thí nghiệm thì các nòi nấm men rượu vang thường có biểu hiện cao hơn về tính chống chịu với cồn, với nhiệt, và tính đề kháng với tác dụng gây đột biến của cồn lên hệ gen ty

thể [79]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng hệ gen ty thể có liên quan đến độ sống sót của tế bào dưới những điều kiện cực đoan này, bằng chứng là việc chuyển ty thể từ các nòi nấm men rượu vang chịu nhiệt và chống chịu cơn sương các nòi nấm men phòng thí nghiệm không chịu nhiệt và không chịu cơn đấm lên cho các nòi nhận có khả năng chống chịu cao hơn với cơn và nhiệt. [31]. Người ta cho rằng sự ức chế cao của cơn đối với *Zygosporium mobilis* (một vi khuẩn sinh cơn) là vì vi sinh vật này không có khả năng biến đổi sự chuyển hóa oxy hóa [75]. Mức bền vững của phenotyp rho<sup>+</sup> dưới điều kiện nhiệt độ cao và nồng độ cơn cao là do chúng sẵn có khả năng hô hấp được dưới những điều kiện này trong khi các ty thể khác không còn duy trì được hoạt động chức năng [79]. Để nghiên cứu vai trò của hệ gen ty thể đối với khả năng hô hấp của tế bào người ta đã chuyển các hệ gen ty thể từ các nòi khác nhau vào một nòi nào đó và thấy có một sự khác biệt to lớn về khả năng sinh trưởng của các nòi nhận khi nuôi cấy trên các nguồn cacbon có thể lên men được [119]. Điều đó cho thấy rõ ràng là có những khác biệt đáng kể giữa hệ gen ty thể của các nòi nấm men khác nhau. Dựa vào các kết quả thí nghiệm thu được J. Jimenes et al [79] thấy việc duy trì được các ty thể có hoạt động chức năng sẽ làm tăng khả năng sống của tế bào nấm men dưới những điều kiện cực đoan của nồng độ cơn cao và nhiệt độ cao và như vậy tính chịu nhiệt và tính chịu cơn được tăng lên. Kết luận này góp phần làm sáng tỏ mối tương quan của tính chống chịu cao đối với cơn và nhiệt độ ở nấm men đã được một số tác giả thu được trong các thí nghiệm khác [31, 40, 162].

Các tác nhân gây đột biến khác nhau tác động lên ADN nên chúng làm hỏng cả hệ gen ty thể và hệ gen nhân [109], trong khi đó cơn dường như chỉ tác động lên ty thể nấm men, nó không có ảnh hưởng di truyền lên nhân của tế bào nấm men [23]. Người ta cho rằng cơn hoạt động như là một tác nhân nhờ việc phá hỏng màng của phức hệ ADN ty thể. Giả thiết này được củng cố khi người ta thấy các đột biến rho<sup>-</sup> được gây tạo bởi hàng loạt các tác nhân hóa học, trong đó một vài tác nhân là các chất phá hủy màng, thí dụ như sodium dodecyl sulphate [26].

Như vậy nếu như cần thể hiện tác dụng gây đột biến của nó do tác dụng lên phức hệ màng của ADN [95] thì phức hệ này ở các nấm men rượu vang là bền vững với cồn hơn là ở các nấm men phòng thí nghiệm. Một khả năng không thể bỏ qua là tính bền vững cao hơn này được quyết định là do trình tự ADN ty thể hơn là do một vài khác biệt alen ở một gen riêng biệt [119]. Người ta đã biết tần số đột biến ngẫu nhiên rho- phụ thuộc vào các trình tự đặc trưng của ADN ty thể [55, 56, 174]. Mặc dù chỉ có một tỷ lệ nhỏ chức năng ty thể là được mã hóa bởi các gen ty thể, nhưng đã có những dẫn liệu cho thấy hệ gen ty thể liên quan trực tiếp đến tính chống chịu cồn và chống chịu nhiệt của tế bào, các đột biến rho- có sự suy giảm cả về sự sinh trưởng và khả năng sống của tế bào ở nhiệt độ cao và trong môi trường có nồng độ cồn cao [17, 28].

### III. Lại và một số thành tựu về lại ở nấm men :

#### 1. Nguyên lý lại và các phương pháp lại :

Lại là một kỹ thuật có những đóng góp hết sức lớn lao cho di truyền chọn giống nấm men. Nó được kết hợp với nhiều kỹ thuật khác để kiểm tra và phân tích cấu trúc di truyền của các thể tái tổ hợp. Đồng thời, nhờ việc phân tích lại mà người ta nhận được một số lượng lớn các thông tin về sự kiểm soát di truyền của nhiều tính trạng ở nấm men, thí dụ các tính trạng về khả năng lên men đường, khả năng tổng hợp các axit amin, các bazơ nitơ, về sự chuyển hóa photpho, vitamin, lipid..., về sự tổng hợp protein, về giới tính, khả năng sinh bào tử, tính bền vững với các loại kháng sinh khác nhau và hàng loạt các tính chất khác [3, 6, 13, 17].

Cũng như đối với bất kỳ vi sinh vật nào khác việc lại nấm men được tiến hành với nhiều mục đích khác nhau. Người ta tạo ra nối lại để sử dụng chúng vào sản xuất trong trường hợp chúng kết hợp được những tính trạng quý của cả hai nối cha mẹ hoặc khi cần nối lại mang ưu thế lại. Trong nghiên cứu người ta dùng đến lại khi cần xác định đặc điểm di truyền của một tính trạng nào đó (được xác định bởi các gen nằm trong nhân hay bởi các gen nằm trong tế bào chất, nó phụ thuộc vào một gen hay nhiều

(mà ...). Người ta phân tích sự phân ly trong thế hệ con theo các tính trạng di truyền (đầu chuẩn) và dựa vào các kết quả thu được để giải cấu trúc di truyền [3, 6, 13, 17].

Việc kết hợp tính chất của hai dạng cha mẹ vào một cá thể lai có thể đạt được bằng hai cách. Thứ nhất, tạo thể lai lưỡng bội, thể lai này ngay từ đầu đã biểu hiện tất cả các tính trạng trội của cả hai dạng cha và mẹ. Ở nấm men sinh sản sinh dưỡng là chủ yếu nên có thể duy trì lâu dài các thể lai dị hợp tử kể trên và sử dụng chúng vào sản xuất. Thứ hai, việc kết hợp các tính trạng của hai dạng cha mẹ có thể đạt được nhờ quá trình tái tổ hợp xảy ra trong giảm phân. Hiện tượng tái tổ hợp theo hai tính trạng thường xuyên xảy ra nhất khi các tính trạng này được xác định bởi hai gen nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau [3, 6, 13, 17].

Kết quả của lai là tạo thành các con lai mà ở nấm men gọi là nòi lai hay thể lai. Đó là tế bào kết hợp được các genotyp của cả hai dạng cha và mẹ. Ở động, thực vật các phương pháp lai và thu nhận con lai thật giản đơn và rõ ràng. Đối với các vi sinh vật thì các phương pháp để lai và nhận biết nòi lai hoàn toàn khác và mang những đặc điểm riêng của mình. Cách tạo ra thể lai trực tiếp nhất (nhưng không phải dễ dàng nhất) là dùng máy vi thao tác đặt hai tế bào thuộc các dạng khác nhau cạnh nhau và theo dõi cho đến khi chúng kết liền với nhau. Vì phải sử dụng máy vi thao tác nên phương pháp này đòi hỏi ~~thiết~~ quen và kinh nghiệm. Lần đầu tiên vào năm 1935 việc lai các nòi *S. cerevisiae* đã thu được kết quả bằng cách ghép đôi các bào tử của các nòi cha mẹ nhờ máy vi thao tác. Bằng cách này người ta có thể qua sát trực tiếp quá trình hình thành hợp tử, cũng như sự nảy mầm của hợp tử. Đặc biệt phương pháp này được sử dụng thành công khi lai các nòi nấm men đồng tặn cũng như khi lai những bào tử mang gen gây chết.

Trên thực tế, thường dùng nhất là phương pháp đánh dấu di truyền có thể dùng phương pháp này để lai các nấm đồng giới, dị giới và cả các đối tượng mà tế bào của chúng rất ít khi kết hợp với nhau. Bằng phương pháp đánh dấu di truyền người ta đã tạo ra được thể lai ở một số loại nấm mà trước đó chưa phát hiện

được giai đoạn phát triển hữu tính [13]. Nội dung của phương pháp đánh dấu di truyền như sau: mỗi dạng cha mẹ được đánh dấu bởi một đột biến nào đó. Thí dụ ở nấm men *S. cerevisiae*, dạng bình thường (tức kiểu dại) tạo nên các khuẩn lạc trắng và nhẵn. Khi đó một dạng cha mẹ được đánh dấu bằng đột biến cho khuẩn lạc màu đỏ, còn dạng cha mẹ thứ hai được đánh dấu bằng đột biến cho khuẩn lạc nhũ xì. Như vậy sau khi trộn lẫn hai nòi cha mẹ và nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa thì các khuẩn lạc có màu trắng và nhẵn chính là thể lai. Trong trường hợp tần số xuất hiện thể lai thấp, chẳng hạn 1/100.000, thì cần đánh dấu các dạng cha mẹ bằng những đột biến cho phép tự động thể lai ra khỏi khối các tế bào cha mẹ trên môi trường chọn lọc đặc biệt. Thí dụ, một dạng cha mẹ được đánh dấu bằng một biến đổi hồi riboflavin (trên môi trường thiếu riboflavin nó không mọc được), dạng cha mẹ kia đánh dấu bằng đột biến đòi hỏi lizin (trên môi trường thiếu lizin nó không mọc được). Nòi lai thừa hưởng được khả năng phát triển không cần lizin của dạng cha mẹ đầu và khả năng phát triển không cần riboflavin của dạng cha mẹ thứ hai và như vậy trên môi trường thiếu cả lizin và riboflavin chúng vẫn có thể phát triển bình thường, trong khi cả hai dạng cha mẹ đều không mọc được. Nhờ thế có thể tách được <sup>ra</sup> thể lai ngay cả khi tần số xuất hiện của nó rất thấp [13]. Phương pháp lai này lần đầu tiên được sử dụng để phân tích sự phân ly của nòi lai, sau đó đã được ứng dụng để lai tạo giống nấm men cho sản xuất. Trong tất cả mọi trường hợp sự giao phối của các tế bào phụ thuộc vào khả năng sống, tình trạng sinh lý và sự nảy mầm. Đối với nấm men dị tảo thì nó còn phụ thuộc vào việc các nòi được đem giao phối có thuộc các kiểu giao phối khác nhau hay không.

Trong di truyền chọn giống nấm men người ta còn sử dụng dung hợp tế bào trần và biến nạp để tạo ra nòi lai. Các kỹ thuật này tạo ra một khả năng to lớn và rất nhiều hứa hẹn do không bị ảnh hưởng bởi mức bội thể và kiểu giao phối [152].

Trong dung hợp tế bào trần, đầu tiên các nòi cha mẹ được bóc toàn bộ hay gần hoàn toàn vỏ tế bào bằng các enzym phân giải, khi đó tế bào chỉ còn được bao quanh bởi màng tế bào

chất và chúng được trộn lẫn với nhau cùng với tác nhân dung hợp gồm polyethylene glycol (PEG) và các ion canxi. Hoạt động của PEG chưa được biết rõ, nó có tác dụng như một polycation tạo nên sự quần tụ nhỏ của các nhóm tế bào trần. Trong quá trình này có thể xảy ra sự trao đổi lẫn nhau của vật liệu di truyền bởi vỏ tế bào đã bị bóc đi. Sau khi dung hợp, sản phẩm dung hợp được đưa vào môi trường đặc chứa sorbitol để tái tạo lại vỏ tế bào. Tuy nhiên, trong một số thực nghiệm dung hợp sau một thời gian các sản phẩm dung hợp mất dần những tính trạng chung tổ hợp được và trở lại dạng cha mẹ ban đầu vì thế mà người ta cho rằng dung hợp không chỉ đặc trưng để biến cái về mặt di truyền các nòi nấn men theo một kiểu mà nhà chọn giống mong muốn. Vì hệ gen của các sản phẩm dung hợp là tổ hợp hệ gen của cả hai dạng cha mẹ nên nó thường rất khác với cả hai dạng cha mẹ ban đầu. Bởi thế nên tương đối khó khăn nếu như chỉ muốn đưa một cách chọn lọc một hoặc một vài đặc tính đơn lẻ từ thế cho vào thế nhận. Biến nạp là một kỹ thuật cho phép khắc phục được nét không đặc trưng của sự dung hợp.

Biến nạp là sự biến đổi các đặc tính của thế nhận bằng ảnh hưởng của ADN tách ra từ thế cho. Cơ sở của hiện tượng này là sự dính các đoạn ADN lấy từ thế cho vào nhiễm sắc thể của thế nhận. Để thực hiện biến nạp cần phải giải quyết 3 vấn đề :  
1) tách chiết ADN từ các nguồn khác nhau. 2) Nối các ADN lại thành một phân tử nguyên vẹn. 3) đưa ADN lại vào tế bào thế nhận. Ngày nay việc tách chiết ADN không còn là một vấn đề khó khăn, nhưng việc tạo một phân tử ADN lại không phải là một công việc đơn giản. Bởi lẽ đoạn ADN cần được chuyển đi không phải là một đoạn ADN bất kỳ mà phải là một đoạn ADN xác định, nó chịu trách nhiệm kiểm soát sự hình thành tính trạng đang được nghiên cứu. Để đưa ADN lại vào tế bào thế nhận người ta sử dụng các vectơ (vật mang) như phago, plasmid. Chúng có thể xâm nhập dễ dàng vào trong tế bào và điều chỉnh yếu là chúng có thể tái bản trong tế bào. Trong số các vấn đề nêu trên thì vấn đề thứ hai là quan trọng nhất. Thông thường để tạo nên các ADN lại người ta sử dụng các men đặc trưng, nhất là ligaza và các endonucleaza giới hạn. Mỗi loại endonucleaza có khả năng nhận biết và cắt phân tử ADN ở một vị trí nhất định tạo nên những đoạn

ADN có đầu tận cùng với một trình tự nucleotit xác định (đầu dính). Khi các đầu dính có trình tự các nucleotit bổ sung cho nhau chúng sẽ nối với nhau nhờ các mối liên kết hydro và dưới tác dụng của ligaza các mối liên kết bền giữa các nucleotit trên cùng một mạch đơn được thực hiện, khi đó ADN được khôi phục toàn vẹn về phương diện vật lý của phân tử [14, 45].

Ở nấm men khi tiến hành biến nạp, đầu tiên tế bào thể nhận được xử lý để trở thành dạng tế bào trần. Lúc đó ADN có thể cho được ủ với tế bào trần của thể nhận cùng với PEG và ion canxi. Sau đó tế bào thể nhận được rửa và được chuyển vào môi trường thích để phục hồi lại vỏ tế bào. Tiếp theo là quá trình chọn lọc các thể biến nạp theo những tính trạng mong muốn.

Trong biến nạp, ADN thể cho có thể nhận được từ những tế bào của một nòi nấm men khác; những tế bào của những loài khác; của những giống khác; của những ngành hoàn toàn khác không có liên quan, thậm chí là ADN được tổng hợp theo con đường hóa học [152].

## 2. Một số thành tựu về lai ở nấm men :

Trong công nghiệp rượu người ta sử dụng nấm men để lên men đường. Nước rỉ đường để nấu rượu chứa từ 0,5% đến 2% đường raphinoza. Nòi *S.cerevisiae* được dùng trong sản xuất không có men melibioza để thủy phân loại đường này mặc dù nó rất thích nghi với việc sinh sản trong rỉ đường và lên men tốt các loại đường khác có trong rỉ đường. Để tạo được loại nấm men vừa có khả năng sinh sản trong rỉ đường vừa lên men được tất cả các loại đường có trong rỉ đường kể cả đường raphinoza, người ta đã lai loại *S.cerevisiae* với loại nấm men *S.carlsbergensis*. Thế lai nhận được đã kết hợp những phẩm chất quý của cả cha và mẹ. Nó sinh sản mạnh trên rỉ đường và cho ra cồn với nồng độ tới 7,43%, trong khi nòi *S.cerevisiae* chỉ cho cồn với nồng độ 6,88% [6, 7]. Người ta cũng đã tạo ra loại nấm men dùng trong sản xuất bia ngọt (loại bia còn chứa đường sacaroza chưa bị oxy hóa) bằng cách lai loài nấm men thường dùng trong công nghiệp bia là *S.carlsbergensis* với loại nấm men *S.globosus*. Loại thứ nhất lên men cả đường sacaroza và mantozo, loại thứ

ngôi không lên men cả hai đường này. Trong số các thể tái tổ hợp người ta đã tách được nổi không lên men đường sacaroza nhưng lên men đường mantoxa. Nổi này được dùng để sản xuất bia ngọt [76].

Bằng dung hợp tế bào trần giữa nổi *S.uvarum* và nổi *S. diastaticus* người ta đã thu được nổi lai có khả năng lên men dextrin và sản sinh cồn cao hơn, đồng thời có sức chống chịu cao hơn đối với những ảnh hưởng âm tính của áp suất thẩm thấu [139]. Cũng bằng dung hợp tế bào trần giữa nổi *S.cerevisiae* và nổi *S.mellis* các tác giả đã thu được nổi lai có khả năng lên men được dung dịch có nồng độ glucoza cao (49% [w/v]) và có khả năng chống chịu với áp suất thẩm thấu cao [101]. Trong sản xuất, để thu nhận sinh khối nấm men người ta phải dùng máy ly tâm trong công đoạn cuối cùng nhằm tách tế bào nấm men ra khỏi môi trường nuôi cấy chúng. Vì vậy, nếu như nổi nấm men được sử dụng có tính kết cụm sẽ mang lại lợi ích kinh tế lớn do giảm bớt được thể tích môi trường cần phải ly tâm. Kết cụm là hiện tượng các tế bào nấm men dính chặt vào nhau thành cục và lắng đọng nhanh chóng trong môi trường chúng được tạo dịch huyền phù. Khi lai nổi nấm men *S.cerevisiae* TJI (là nấm men kết cụm tốt nhưng chống chịu cồn kém) với nổi nấm men *S. cerevisiae* N.1 (là nấm men kết cụm kém nhưng chống chịu cồn tốt), người ta đã thu được nổi lai có đặc tính kết cụm tốt và có thể sản sinh 12,45 (w/v) cồn [145]. Các nổi nấm men bia dùng trong công nghiệp thường là đa bội, thậm chí là lệch bội vì thế chúng thường sinh bào tử kém và khả năng sống của bào tử thấp [152]. Do đó điều thú vị nhất về có ý nghĩa thực tiễn lớn của các thực nghiệm dung hợp là các sản phẩm dung hợp so với các nổi nấm men bia cha mẹ có khả năng sinh bào tử tăng lên một cách đáng kể. Trong khi các nổi nấm men bia thường sinh bào tử yếu và tạo ra các nang chỉ có 1 hoặc 2 bào tử, thì các sản phẩm dung hợp của chúng có khả năng sinh bào tử tốt và tỷ lệ các nang chứa 4 bào tử khá cao. Kết quả này tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích di truyền học các nổi nấm men bia [152].

Sử dụng biến nạp ADN tách chiết từ các nổi nấm men có khả năng lên men được mantotrioxa với các nổi nấm men chỉ có khả năng lên men mantoxa, người ta đã thu được các sản phẩm

biến nạp có khả năng lên men cả mantozơ và mantotriozơ [14].

Người ta sử dụng men lipaza để thủy phân các chất béo thành các phân tử nhỏ hơn dùng trong việc sản xuất kẹo. Bằng công nghệ di truyền người ta đã đưa gen tổng hợp men này vào loại vi khuẩn chịu nhiệt *Bacillus stearothermophilus*. Vi khuẩn này có nhiệt độ sinh trưởng là 65°C. Nhiệt độ này giết chết những vi sinh vật khác, điều đó có tác dụng khử trùng sản phẩm. Đồng thời ở nhiệt độ này các chất béo sẽ hóa lỏng dễ dàng hơn vì vậy không cần phải dùng đến những dung môi cần thiết để hòa tan chất béo. Các kết quả này làm giảm giá thành của sản phẩm [15].

Các thành tựu sinh học đã được sử dụng trong công nghiệp hàng thế kỷ này. Tuy nhiên, các tiến bộ gần đây về sinh học tế bào và sinh học phân tử đã cho phép người ta dự đoán một cách tin tưởng hơn đối với các sản phẩm sẽ được tạo ra. Ngày nay, các thao tác di truyền đã trở thành một việc làm thực hành và thông dụng. Những tiến bộ này đã được đưa vào sử dụng trong một lĩnh vực riêng là CÔNG NGHỆ SINH HỌC.

к 6 т 9 у 1 н 0 н 1 6 н 0 с 1 0

trên đồng đĩa hong của Gougeon Model 851.

6. Phương pháp xác định khả năng chịu nồng độ cồn: Cây trên môi trường (đồng hợp có độ rang 5%, 10%, 15%, 20% cồn 92° (v/v). Đọc kết quả sau 48 giờ.

7. Phương pháp xác định khả năng chịu pH thấp: Cây trên môi trường YPG có pH 3; 5: 2 với hệ đệm phosphat [3]. Đọc kết quả sau 48 giờ.

8. Phương pháp xác định khả năng chịu áp suất thẩm thấu: Cây trên môi trường có 1,5, 50%, 80% glucose. Đọc các kết quả sau 48 giờ.

Trong toàn bộ các thí nghiệm được tiến hành ở 30°C, riêng thí nghiệm về khả năng chịu nhiệt được tiến hành song song ở 3 nhiệt độ 30°C, 37°C, 42°C.

4.3.2. II - PHẦN THÍ NGHIỆM

1. Ngươi các đặc điểm sinh lý được trình bày tóm tắt trong bảng 1 chúng tôi đã đặt 4 thí nghiệm nghiên cứu thêm về các đặc điểm này. Kết quả cho thấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TH<sub>2</sub> - 30 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có áp suất thẩm thấu cao (50% glucose), môi trường tổng hợp 12% cồn (v/v), môi trường YPG có hệ đệm phosphat pH 2,5 và môi trường không có vitamin.

Bảng 1

Tóm tắt các đặc điểm sinh lý nấm men men chịu nhiệt *Saccharomyces cerevisiae* TH<sub>2</sub> - 30

Nguồn cacbon	Lên men	Đồng hóa
Glucose	+	+
Galactose	-	-
Maltose	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	-	-
Melibiose	-	-
Lactose	-	-
Cellulose	-	-
Molizitose	-	-
Raffinose	+	+
Inulin	+	+
Tinh bột tan	+	+
Xylose	-	-
Cồn	-	+
Inositol	-	+
Manitol	-	-
Rhamnose	-	-
Arabinose	-	-

2. Để tiến hành nghiên cứu di truyền học chúng tôi đã điều tra khả năng hình thành bào tử của nòi TH<sub>2</sub>-30 trên các môi trường sinh bào tử khác nhau, kết quả như sau trên môi trường sinh bào tử số 1 sau 5 ngày tỷ lệ hình thành bào tử là 10,5%. Kích thước trung bình của nang là 9x7,6 (micromet). Trên môi trường sinh bào tử số 2 sau 3-4 ngày, tỷ lệ hình thành bào tử là 24% và kích thước trung bình của bào nang là 6,9x6,1 (micromet). Trên môi trường sinh bào tử số 3 sau 10 ngày, tỷ lệ hình thành bào tử là 10%.

Bảng 2

Khả năng hình thành bào tử trên các môi trường sinh bào tử khác nhau của nòi *Saccharomyces cerevisiae* TH<sub>2</sub> - 30

Môi trường sinh bào tử	Tỷ lệ hình thành bào tử (%)	Thời gian hình thành bào tử (ngày)	Kích thước nang (micromet)
Môi trường sinh bào tử số 1	10,5	5	9x7,6
Môi trường sinh bào tử số 2	24	3-4	6,9x6,1
Môi trường sinh bào tử số 3	10	10	6,5x5,5

3. Để phát hiện đặc điểm di truyền của các thể con, chúng tôi đã dùng máy vi tia tạo tác lệch lặn từ 10 các nang sau thí nghiệm chúng tôi dịch cấy vào ống nghiệm 11, lỏng số đã tách được 63 nang gồm 260 bào tử. Bảng 3 trình bày tỉ lệ nảy mầm sót của các bào tử sau khi tách ra khỏi nang và nuôi cấy trên môi trường YPG. Trong số 63 nang đã tách được thì 50 nang có 4 bào tử sống sót (79,02%) 11 nang có 3 trong số 4 bào tử sống sót (6,32%) và 4 nang có 2 bào tử sống sót (6,36%). Như vậy có 214 bào tử sống sót trong số 260 bào tử đã tách được đạt tỷ lệ sống sót 82,7%.

4. Kiểm soát sự phân ly theo tính chịu nhiệt của các thể phân ly đã tách từ mỗi nang cho thấy (bảng 4): ở 30°C có 1 thể phân ly mọc tốt sau 48 giờ nuôi cấy, ở 37°C các thể phân ly mọc tốt sau 72 giờ nuôi cấy, nhưng ở 42°C có sự phân ly như sau: trong số 30 nang có 21 nang có kiểu phân ly 1+3 (1 bào tử mọc ở 42°C; 3 bào tử không mọc ở 42°C) (70%), 6 nang có kiểu phân ly 2+2 (16,7%) và 1 nang có kiểu phân ly 3+1 (3,3%).

5. Để kiểm soát sự phân ly theo tính chịu pH thấp chúng tôi đã cấy các thể phân ly

Khả năng sống sót của các bào tử tách ra từ môi trường của *Saccharomyces cerevisiae* TH<sub>2</sub>-30

Số bào tử sống sót tách ra từ 1 nang.	1	2	3	4	0	Tổng số
Số nang đủ tách	30	11	4	0	0	45
Tỷ lệ sống sót (%)	74,02	18,92	8,16	0	0	100

trên môi trường YPG với pH 3: 2,5; 2. Kết quả cho thấy ở pH 3 và 2,5 không có sự phân ly - tất cả các thể phân ly đều mọc tốt sau 48 giờ nuôi cấy. Ở pH 2 có sự phân ly như sau: 2 nang trong số 30 nang có kiểu phân

ly 1:3 (1 bào tử mọc tốt ở pH 2, 3 bào tử không mọc) chiếm 23%, 13 nang có kiểu phân ly 2:2 chiếm 40% và 11 nang có kiểu phân ly 3:1 chiếm 37%

Bảng 4

Sự phân ly theo tính chịu nhiệt của các bào tử tách từ mỗi nang

Kiểu phân ly	0 : 4 (+) (-)		1 : 3 (+) (-)		2 : 2 (+) (-)		3 : 1 (+) (-)		4 : 0 (+) (-)		Tổng
	Số nang	0	0	34	0	5	0	0	0	0	
Tỷ lệ %	0	0	80	0	16,7	0	0	0	0	100	

Chú thích: (+) mọc tốt ở 42°C; (-) không mọc ở 42°C

Bảng 5

Sự phân ly theo khả năng chịu pH thấp (pH2) của các bào tử tách từ mỗi nang của *Sacch. cerevisiae* TH<sub>2</sub>-30 ở 20°C

Kiểu phân ly	0 : 4 (+) (-)		1 : 3 (+) (-)		2 : 2 (+) (-)		3 : 1 (+) (-)		4 : 0 (+) (-)		Tổng số
	Số nang	0	0	7	0	12	0	11	0	0	
Tỷ lệ %	0	0	23	0	40	0	37	0	0	100	

Chú thích: (+) Mọc tốt ở pH2  
(-) Không mọc ở pH2

8. Để khảo sát khả năng tích lũy sinh khối của bào tử tách ra từ mỗi nang chúng tôi đã nuôi cấy chúng 48 giờ trên môi trường YPG định thể (5ml/ống). Kết quả cho thấy (bảng 6): 30% số nang có các bào tử phân ly theo

kiểu 1:3 (1 bào tử có khả năng tích lũy sinh khối lớn hơn gấp 2 lần so với bào tử trong cùng 1 nang), 53,3% số nang có các bào tử phân ly theo kiểu 2:2, và 26,7% số nang có bào tử phân ly theo kiểu 3:1.

Bảng 6

Sự phân ly của các bào tử tách từ mỗi nang theo khả năng tích lũy sinh khối của *Sacch. cerevisiae* TH<sub>2</sub>-30 ở 20°C

Kiểu phân ly	0 : 4 (+) (-)		1 : 3 (+) (-)		2 : 2 (+) (-)		3 : 1 (+) (-)		4 : 0 (+) (-)		Tổng số
	Số nang	0	0	6	0	16	0	8	0	0	
Tỷ lệ %	0	0	25	0	53,3	0	26,7	0	0	100	

Chú thích: (+) Khả năng tích lũy sinh khối lớn hơn gấp 2 lần  
(-) Khả năng tích lũy sinh khối nhỏ hơn 2 lần

7.10 khảo sát sự phân ly của các bào tử trên môi trường theo tính chịu mặn, chúng tôi thấy chúng trên môi trường tổng hợp có độ muối 5%, 10%, 15%, 20% đều 90% (v/v). Tất cả các thể phân ly đều mọc tốt ở nồng độ 3% và 10% cồn. Ở các nồng độ cao hơn 15% không có sự phân ly rõ rệt và tất cả các thể phân ly không mọc được ở nồng độ 20% cồn.

8. Nghiên cứu sự phân ly của các bào tử tách ra từ mỗi nang theo khả năng chịu áp suất thẩm thấu chúng tôi cũng chứng trên môi trường có chứa 40%; 50%; 60% glucosa. Không thấy có sự phân ly. Tất cả các thể phân ly mọc tốt trên môi trường chứa 40% glucosa sau 48 giờ. Trên môi trường 50% glucosa tất cả các thể phân ly mọc tốt sau 72 giờ, và mọc yếu hoặc không mọc trên môi trường 60% glucosa sau 14 ngày theo dõi.

### III - BÀN LUẬN

Khoảng hình thành bào tử là một trong những điều kiện cần thiết đối với đối tượng nấm men được lựa chọn để nghiên cứu di truyền học. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khả năng tạo bào tử của nấm men chịu nhiệt  $T_{H_2}-30$  trên các môi trường sinh học từ khác nhau. Kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành bào tử cao nhất (21%) ở môi trường tổng hợp môi trường sinh học từ sữa sau 3-4 ngày nuôi cấy lắc và thấp nhất (0,5%) cho môi cấy trên môi trường sinh học từ số 2 sau 10-15 ngày. Nang bào tử của môi trường  $T_{H_2}-30$  có hình thái điển hình của các môi trường *Saccharomyces cerevisiae*. Mỗi nang gồm 4 bào tử. Nang có dạng hình thoi, kích thước thay đổi tùy từng loại môi trường (bảng 2). Nang lớn nhất có  $0 \times 7,0$  (micromet). Khi nuôi cấy trên môi trường sinh học từ 1. Thời gian hình thành bào tử ngắn nhất là 3-5 ngày, khi nuôi cấy trên môi trường sinh học từ số 2 và dài nhất là 10-15 ngày khi nuôi cấy trên môi trường sinh học từ số 3. Mỗi trường số 2 cho tỷ lệ hình thành bào tử cao nhất (21%) và thời gian hình thành bào tử ngắn nhất (3-4 ngày) (bảng 2).

Để nâng cao số lượng của các bào tử sau khi tách ra khỏi nang và nuôi cấy trên môi trường YPG cao; 201 bào sống trong số 300 bào tử đã tách được. Tỷ lệ sống đạt 67%.

Việc khảo sát sự phân ly bào tử theo tính chịu nhiệt cho thấy các thể phân ly của  $T_{H_2}-30$  có thể mọc tốt ở 37°C sau 72 giờ.

Ở 37°C thấy có sự phân ly như sau: 60% số nang đã phân ly theo kiểu 1:3, 16,7% số nang phân ly theo kiểu 2:2 và 2,3% số

nang phân ly theo kiểu 3:1. Các tỷ lệ phân ly này rõ ràng cho thấy ít nhất có 2 gen nằm trên 3 nhiễm sắc thể khác nhau xác định khả năng chịu nhiệt độ 42°C của môi trường  $T_{H_2}-30$ .

Sự phân ly theo khả năng chịu pH thấp của các bào tử thể hiện rõ rệt khi nuôi cấy trên môi trường YPG với pH2 2,3% số nang có các bào tử phân ly theo kiểu 1:3, 40% số nang có các bào tử phân ly theo kiểu 2:2 và 37% số nang có các bào tử phân ly theo kiểu 3:1. Tỷ lệ phân ly này cũng cho thấy ít nhất có 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau quyết định tính trạng chịu pH2 của môi trường  $T_{H_2}-30$ .

Khi khảo sát khả năng tích lũy sinh khối của các thể phân ly trên môi trường YPG định thể chúng tôi thấy có sự phân ly rõ rệt. Tỷ lệ 20% số nang có bào tử phân ly theo kiểu 1:3, và 53,3% số nang có bào tử phân ly theo kiểu 2:2 và 36,7% số nang có các bào tử phân ly theo kiểu 3:1 cho thấy có 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau kiểm soát khả năng tạo sinh khối ở môi trường  $T_{H_2}-30$ .

Tính chất phân ly giống nhau của các bào tử đối với các tính trạng chịu nhiệt độ 42°C, chịu pH2 và kiểm soát sinh khối gọi cho ta khả năng liên kết của các gen kiểm soát các tính trạng nói trên. Nhưng các số liệu thu được đã khẳng định rằng các gen đó hoàn toàn không liên kết với nhau, chúng nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau.

Các kết quả khảo sát sự phân ly của các bào tử theo tính chịu nồng độ cồn cao và chịu áp suất thẩm thấu cao cho thấy các bào tử tách từ mỗi nang có khả năng sinh trưởng trên môi trường 10% cồn và 50% glucosa. Nhưng nồng độ cồn cao hơn (15% và 20%) và ở độ đường cao hơn (60% glucosa) thì chúng không mọc. Không có sự phân ly theo tính chịu nồng độ cồn cao và tính chịu áp suất thẩm thấu cao. Tất cả thể các gen kiểm soát tính trạng này nằm trong cấu trúc tế bào của môi trường  $T_{H_2}-30$ .

### IV - KẾT LUẬN

1.  $T_{H_2}-30$  là 1 môi trường men có một loại thể tế bào (thể 1) 2n dị hợp tử về tính chịu nhiệt độ cao, tính chịu pH thấp và về khả năng sinh bào tử tốt, đã được tiến hành vào nghiên cứu về di truyền học.

2. Tính trạng chịu 42°C, tính trạng chịu pH2 và tính trạng kiểm soát sinh khối ở môi trường  $T_{H_2}-30$  là do các gen trên nhiễm sắc thể qui định. Mỗi tính trạng đó có thể do 2 gen nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau kiểm soát.

3. Các gen xác định 3 tính trạng nói trên không liên kết với nhau.

4. Các gen xác định khả năng chịu độ cồn cao và chịu áp suất thẩm thấu cao rất có thể nằm trong các đầu trúc tế bào của TH<sub>2</sub>-30.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. БАНАРОН И. А., КОЖИН, 1976: Сравнительный метод по определению дрожжей с помощью микроскопа.

2. Đặng Dương Bằng, (1982): Một số nghiên cứu phân lập từ chuối có khả năng chống chịu với nồng độ cồn cao và nồng độ đường cao.

« Báo cáo Khoa học đã tài cấp Nhà nước », Trung tâm Visinh ứng dụng - Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.

3. Nguyễn Văn Đông, 1970: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Tập I, trang 80. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.

4. Fred Sherman Gerald, A. Pink, Christopher W. Lawrence, 1971: Methods in yeast

genetics. Laboratory manual cold spring Harbour Lab, New York June 14.

5. Jean L. Sherman, J. D. Levi, 1974: The growth of yeast on Hydrocarbons. The progress in Industrial Microbiology vol 13, Edited by D. J. D. Hockenhath. P: 35.

6. Bocking A. J., I. W. FTaylor, C. M. Hallam, 1984: Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. Applied Microbiology and Biotechnology vol 19, N<sup>o</sup> 5, p 361.

7. Kojima, 1966: Physiology of thermotolerant yeasts. Yeasts the proceeding of the 11<sup>th</sup> symposium on yeasts held in Bratislava 16-21.

8. Rodriguez de Miranda, J. Yarrow D., 1971: The maintenance of stock cultures of yeasts. Yeasts model in science and techniques. Proceeding of the first international symposium on yeast Science.

9. Saitou K., 1964: Thermotolerant yeast from a waste plant for industrial waster and some of yeast.

Yeast the proceeding of the prehabilities of the 11<sup>th</sup> Symposium on yeast held in Bratislava.

## BIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE THERMOTOLERANT YEAST STRAIN SACCH. CEREVISIAE TH<sub>2</sub> - 30 ISOLATED FROM BANANA

DANG DUONG BANG et al.

### SUMMARY

The thermotolerant (42°C) yeast strain *Sacch. cerevisiae* TH<sub>2</sub> - 30 isolated from ripe banana was undertaken for molecular. 260 spores were isolated by micromanipulator and investigated in relation of thermic resistance (42°C), acid resistance (pH = 2), alcoholic resistance (12%), osmotic resistance (50% glucose) and biomass accumulation.

The TH<sub>2</sub> - 30 strain was shown to be heterozygous for chromosomal genes controlling thermotolerance, acid resistance and biomass production. For alcohol tolerance and osmotic resistance segregation was observed.

Nhận bài ngày: 10-9-1986

## ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ TÍNH TRẠNG CHỐNG CHỊU VÀ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA NƠI NẤM MEN TH-4 PHÂN LẬP TỪ RƯỢU VANG DẦU

LÀ Đình Lương, Nguyễn Văn Hưng  
Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội

*Đặc điểm di truyền học của các tính trạng liên quan trực tiếp đến năng suất và quan trọng đối với sản xuất, được nghiên cứu ở một nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TH-4 phân lập từ rượu vang dầu. Kết quả cho thấy TH-4 có mức bội thể rất thấp. Di sinh bào tử tốc độ hợp tử và tính đẳng-dị tử, tính chịu cồn (18%), khả năng tích lũy sinh khối, tính chịu nhiệt (42°C) và chịu axit (pH = 2). Đồng thời có thể dự đoán tính đẳng-dị tử, tính chịu cồn và khả năng tích lũy sinh khối, mỗi tính trạng đều do 1 gen trên nhiễm sắc thể quy định, các gen này không liên kết với nhau. Tính chịu nhiệt, chịu axit - mỗi tính trạng ở một do 1 gen trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau k. l. m. n. o. p.*

Cứ về mặt số lượng lớn về mặt kinh tế nấm men là nhóm Vi sinh vật quan trọng nhất mà công nghệ sử dụng từ trước đến nay. Tổng số nấm men sinh ra hàng năm từ các ngành sản xuất đến hàng triệu tấn. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới, ở Việt Nam khu hệ vi sinh vật trong tự nhiên phong phú dễ gây nhiễm trùng môi trường nuôi cấy, trình độ công nghệ vi sinh vật chưa phát triển và điều kiện trang thiết bị chưa cho phép để duy trì các thông số môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm men. Vì vậy việc ứng dụng nấm men vào sản xuất của bất kỳ quốc gia nào. Trong hoàn cảnh đó việc tạo những nơi nấm men mang các tính trạng chống chịu được ứng dụng vào sản xuất phù hợp với từng điều kiện cụ thể là nhu cầu hết sức cần thiết.

Nhằm góp phần sử dụng hợp lý nguồn gen phong phú trong tự nhiên, xác định cơ sở khoa học của công tác chọn giống nấm men có các tính trạng ưu việt cho sản xuất, trước đây chúng tôi đã tiến hành điều tra sinh học nơi nấm men chịu nhiệt TH-30 phân lập từ chuối. Lần này để làm sáng tỏ thêm bản chất di truyền của các tính trạng kể trên chúng tôi điều tra đặc điểm di truyền học của tính chịu nhiệt (42°C), chịu ethanol (18%), chịu pH thấp (pH=2) và khả năng tích lũy sinh khối của nơi nấm men TH-4 phân lập từ rượu vang dầu.

### 1. Vật liệu và phương pháp

Nơi TH-4 do Trung tâm VSVUD cấp, môi trường và các điều kiện thí nghiệm sử dụng theo các tác giả (Dạng Dương Bằng, ..., 1987; Nguyễn Lâm Dũng, 1970; Sherman et al., 1983; Stewart, 1981; Zakharov et al., 1976; Kosičov, 1979). Riêng việc xác định sự phân ly về khả năng tích lũy sinh khối của các bào tử tách từ nang được thực hiện bằng máy vi thao tác trên môi trường tổng hợp đủ sau khi đã xử lý nơi sinh bào tử bằng dịch dạ dày ốc sên. Ở 30°C trong 48 giờ, đo kích thước của các

khuyến lạc hình thành từ các bào tử. Số liệu được xử lý bằng các phương pháp toán thống kê.

## 2. Kết quả thí nghiệm

2.1. Nồi TH-4 có khả năng sinh bào tử tốt. Sau 4 ngày tỷ lệ hình thành bào tử đạt 70%. Đặc điểm di truyền của các tính trạng được nghiên cứu bằng cách tách 69 nang gồm 276 bào tử. Trong số đó (bảng 1) 31 nang có cả 4 bào tử sống sót (44,93%), 16 nang - 3 bào tử sống sót (23,19%), 13 nang - 2 bào tử sống sót (18,84%), 4 nang - 1 bào tử sống sót (5,8%) và 5 nang không có bào tử sống sót (7,25%). Tổng cộng có 202 bào tử sống sót trong tổng số 276, đạt tỷ lệ 73,19%.

*Vital Capacity of the spores isolated from TH4 strains*  
**Bảng 1. Khả năng sống sót của các bào tử tách ra từ mỗi nang của nồi nấm men TH-4**

Số bào tử sống sót từ mỗi nang	4:0 (+)(-)	3:1 (+)(-)	2:2 (+)(-)	1:3 (+)(-)	0:4 (+)(-)	Tổng số
Số nang đã tách	31	16	13	4	5	69
Tỷ lệ sống sót(%)	44,93	23,19	18,84	5,80	7,25	73,19

Chú thích: (+) - Bào tử sống, (-) - Bào tử chết.

2.2. Ở nồi TH-4 các bào tử tách ra từ mỗi nang có sự phân ly rõ rệt về kích thước khuẩn lạc: Trong số 202 khuẩn lạc sống sót có 100 khuẩn lạc loại lớn với đường kính 2-3 mm và 102 - loại nhỏ với đường kính 1 - 1,5 mm. Dùng phương pháp thống kê xác định sự sai khác của tỷ số

*Segregation on biomass accumulation*  
**Bảng 2. Sự phân ly về kích thước khuẩn lạc của các thể phân ly tách ra từ nồi nấm men TH-4**

Kiểu phân ly	0:4 (+)(-)	1:3 (+)(-)	2:2 (+)(-)	3:1 (+)(-)	4:0 (+)(-)	Tổng
Số nang	0	3	27	0	1	31
Tỷ lệ (%)	0	9,67	87,1	0	3,23	100

Chú thích: (+) - Khuẩn lạc lớn, (-) - Khuẩn lạc nhỏ.

này so với tỷ số lý thuyết 50% khuẩn lạc loại nhỏ/50% khuẩn lạc loại lớn khi tình trạng này do 1 gen trên nhiễm sắc thể kiểm soát. Kết quả tính toán cho thấy  $P > 1\%$ , chứng tỏ tần số quan sát phù hợp với tần số lý thuyết ở mức ý nghĩa 1%. Đồng thời khi phân tích các nang sống cả 4 bào tử cũng cho

thấy 3 nang (Bảng 2) trong số 31 nang có kiểu phân ly 1:3 (1 có khuẩn lạc loại lớn và 3 - loại nhỏ) chiếm 9,67%, 27 nang có kiểu phân ly 2:2 chiếm 87,1% và 1 nang có kiểu phân ly 4:0 chiếm 3,23%.

2.3. Mức bội thể của TH-4 được kiểm tra bằng cách xét khả năng sinh bào tử của các thể phân ly của chúng. Kiểm tra 104 thể phân ly (Bảng 3) hình thành từ 26 nang cho kết quả 100% nang phân ly theo kiểu 2:2 (2 trong số 4 thể phân ly hình thành từ 1 nang có khả năng sinh bào tử).

*Segregation on spore-forming ability*  
Bảng 3. Sự phân ly về khả năng sinh bào tử  
của các thể phân ly tách ra từ nòi nấm men TH-4

Kiểu phân ly	2:2 (+)(-)	Tổng số	Chú thích: (+) - Sinh bào tử (-) - Không sinh bào tử
Số nang	26	26	
Tỷ lệ (%)	100	100	

2.4. Khảo sát sự phân ly theo tính trạng chịu nhiệt độ cao cho thấy: ở 30 oC các thể phân ly mọc tốt, nhưng ở 42 oC sau 72 giờ nuôi cấy có sự phân ly (Bảng 4); 1 trong số 26 nang phân ly theo kiểu 0:4 (ở 42 oC không có thể phân ly nào mọc được cả) chiếm 3,85%; 4 nang phân ly theo kiểu 1:3 (1 thể phân ly mọc được ở 42 oC, 3 thể còn lại không mọc được) chiếm 15,38%; 15 nang phân ly theo kiểu 2:2 chiếm 57,7% và 5 nang có kiểu phân ly 3:1 chiếm 19,23%.

*Segregation on thermotolerance*  
Bảng 4. Sự phân ly về khả năng chịu nhiệt  
của các thể phân ly tách ra từ nòi nấm men TH-4

Kiểu phân ly	0:4 (+)(-)	1:3 (+)(-)	2:2 (+)(-)	3:1 (+)(-)	4:0 (+)(-)	Tổng số
Số nang	1	4	15	5	1	26
Tỷ lệ (%)	3,85	15,38	57,7	19,23	3,85	100

Chú thích: (+) - Mọc ở 42 oC, (-) - Không mọc ở 42 oC.

2.5. Sự phân ly theo tính trạng chịu cồn được khảo sát bằng cách nuôi cấy trên môi trường tổng hợp đủ có bổ sung: 14,16,18,20% cồn 99,9% theo thể tích. Kết quả (Bảng 5) trên môi trường có bổ sung 14, 16% cồn, các thể phân ly mọc tốt sau 2 ngày nuôi cấy; trên môi trường 18% cồn các thể phân ly mọc tốt sau 4 ngày nuôi cấy; Trên môi trường cồn 20% sau 12 ngày nuôi cấy có sự phân ly: 23 trong số 27 nang phân ly theo kiểu 2:2 (2 thể phân ly mọc, 2 thể không mọc), đạt tỷ lệ 85,19%; 1 nang phân ly theo kiểu 3:1 - 3,7% và 3 nang - theo kiểu 4:0 - 11,11%.

### *Segregation on alcohol resistance*

**Bảng 5. Sự phân ly theo tính chịu cồn của các bào tử tách ra từ môi nấm men TH-4.**

Kiểu phân ly	0:4 (+)(-)	1:3 (+)(-)	2:2 (+)(-)	3:1 (+)(-)	4:0 (+)(-)	Tổng số
Số nang	0	0	23	1	3	27
Tỷ lệ (%)	0	0	85,19	3,7	11,11	100

Chú thích : (+) - Mọc trên môi trường 20% cồn.  
(-) - Không mọc trên môi trường 20% cồn.

2.6. Sự phân ly theo tính chịu pH thấp được kiểm tra bằng cách cấy các thể phân ly trên môi trường tổng hợp với thang pH: 3, 2,5 và 2.

### *Segregation on axit tolerance*

**Bảng 6. Sự phân ly theo tính chịu pH thấp của các bào tử tách ra từ môi nấm men TH-4**

Kiểu phân ly	0:4 (+)(-)	1:3 (+)(-)	2:2 (+)(-)	3:1 (+)(-)	4:0 (+)(-)	Tổng số
Số nang	0	2	6	10	10	28
Tỷ lệ (%)	0	7,14	21,43	35,71	35,71	100

Chú thích : (+) - Mọc trên môi trường pH = 2.  
(-) - Không mọc trên môi trường pH = 2

Kết quả trong môi trường pH = 3 và 2,5 không có sự phân ly, tất cả đều mọc tốt; ở pH=2 có sự phân ly (Bảng 6) : 2 trong số 28 nang phân ly theo kiểu 1:3 (1 mọc được, 3 không) chiếm tỷ lệ 7,14%; 6 nang - 2:2, chiếm tỷ lệ 21,43%; 10 nang - 3:1 chiếm 35,71% và 10 nang - 4:0, chiếm 35,71%.

### 3. Thảo luận

Hình thành bào tử là một trong những thuộc tính cần thiết để nghiên cứu di truyền học đối với nấm men được lựa chọn. Nồi TH-4 sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường sinh bào tử đạt tỷ lệ hình thành bào tử 70%. các nang có dạng hình thoi chứa 4 bào tử. Các bào tử sau khi tách khỏi nang và được nuôi cấy trên môi trường đủ tổng hợp có khả năng sống sót tương đối cao (73,19%) đủ cho các thí nghiệm phân tích di truyền học. Với 9,67% số nang có kiểu phân ly 1:3; 87,1% - theo kiểu 2:2 và 3,23% - theo kiểu 4:0 cho thấy khả năng tích lũy sinh khối ở nồi TH-4 có thể do 1 gen nằm trên nhiễm sắc thể kiểm soát. Những sai lệch vượt ra ngoài tỷ số 2:2 có thể do sai trong kỹ thuật.

Kiểm tra khả năng sinh bào tử của các thể phân ly cho thấy nồi TH-4 có mức bội thể tối thiểu 2n

và dị hợp tử về locut quy định tính đồng tồn và dị tồn. Vì vậy khi tiếp tục phân tích các tính trạng kinh tế của TH-4 chỉ nên bắt đầu với các thể phân ly không có khả năng sinh bào tử.

Khảo sát sự phân ly theo tính chịu nhiệt cho thấy các thể phân ly của سوی TH-4 ở 42°C sau 72 giờ nuôi cấy có sự phân ly (bảng 4). Các kết quả này chứng tỏ ít nhất có 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau xác định khả năng chịu nhiệt ở سوی nấm men TH-4.

Sự phân ly theo khả năng chịu cồn thể hiện rõ rệt khi nuôi cấy trên môi trường đã tổng hợp có bổ sung 20% cồn, 85,19% số nang có kiểu phân ly 2:2, 3,7% phân ly theo kiểu 3:1 và 11,11% số nang có kiểu phân ly 4:0 (Bảng 5). Tỷ lệ phân ly đó chứng tỏ tính chịu cồn của سوی nấm men TH-4 có thể do 1 gen nằm trên nhiễm sắc thể kiểm soát.

Kết quả khảo sát khả năng chịu pH thấp của các thể phân ly trên môi trường có pH = 2 (Bảng 6) cho thấy ít nhất có 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau quyết định tính trạng chịu pH=2 của سوی TH-4. Như vậy ở سوی TH-4, khả năng tích lũy sinh khối, tính đồng-dị tồn và tính chịu cồn đều do 1 gen quy định. Nếu ký hiệu các gen tương ứng là Bیا (Biomass accumulation), Tha (Thalium), Alt (Alcoholtolerance) và giả thiết rằng genotyp của 2 dạng cha và mẹ của سوی TH-4 là BIA/BIA THA/THA ALT/ALT (Khuan lạp lớn, tự lưỡng bội, chịu cồn) và bیا/bیا tha/tha alt/alt (khuan lạp nhỏ, không tự lưỡng bội hóa, không chịu cồn) thì genotyp của سوی TH-4 sẽ là BIA/bیا THA/tha ALT/alt. Các gen này có liên kết với nhau hay không được xác định bằng số hợp các kiểu nang P (Parental), N (Nonparental), T (Tetraye) với từng cặp gen một. Tần số xuất hiện các kiểu nang với từng cặp gen được nêu trong bảng 7.

Trên cơ sở của những kết quả này có thể kết luận 3 gen nói trên là không liên kết với nhau; còn về sự liên kết của tính chịu nhiệt và tính chịu axit đang được chứng tỏ tiếp tục khảo nghiệm.

### The types of asci P, N, T for 3 gene pairs

Bảng 7. Các kiểu nang P, N, T đối với 3 cặp gen BIA/bیا - THA/tha, BIA/bیا - ALT/alt và THA/tha - ALT/alt

Các cặp gen	Các kiểu nang			$\chi^2$	$\chi^2_{\alpha}$ ( $\alpha = 0,01$ )
	P	N	T		
BIA/bیا - THA/tha	1	3	20	3,50	9,21
BIA/bیا - ALT/alt	6	1	14	3,57	9,21
THA/tha - ALT/alt	2	5	15	1,25	9,21

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi về đặc điểm di truyền các tính trạng tích lũy sinh khối, tính chịu nhiệt, chịu pH thấp ở سوی nấm men TH-4 thu được tương tự như ở سوی nấm men TH-30. Khả năng chịu cồn cao của سوی nấm men TH-4 là do các gen trong nhân quy định; trong khi đó, ở سوی TH-30 dấu hiệu này lại có thể do các gen nằm trong tế bào chất quy định (Đặng Dương Bằng... 1987). Để có được những kết luận chính xác hơn về bản chất di truyền của các tính trạng trên chúng tôi đang tiến hành giao phối giữa các cặp bố mẹ mang tính trạng đối lập nhau và phân tích di truyền học sự di truyền các tính trạng này ở thế lai.

## KẾT LUẬN

1. TH-4 là nòi nấm men có mức bội thể tối thiểu là 2n, có khả năng sinh bào tử tốt, tỷ lệ sống sót của các bào tử tách ra từ mỗi nang tương đối cao, đảm bảo đủ cho các phân tích di truyền học. TH-4 dị hợp tử về tính đồng-dị tán, tính chịu nhiệt độ cao, tính chịu pH thấp, tính chống chịu với hàm lượng ethanol cao và khả năng tích lũy sinh khối.

2. Tất cả các tính trạng nói trên đều do các gen trong nhân quy định. Tính đồng-dị tán, tính chịu cồn và khả năng tích lũy sinh khối có thể do 1 gen quy định, các gen này không liên kết với nhau. Tính chịu nhiệt độ cao, chịu pH thấp đều do ít nhất 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau kiểm soát.

3. Sự di truyền những tính trạng kể trên ở thế lai có thể được xác định bằng cách giao phối giữa các cặp bố mẹ mang những tính chất đối lập nhau về một trong những tính trạng đó.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Dương Bằng, Lê Thanh Lâm, Lê Đình Lương, 1987. Điều tra sinh học nòi nấm men chịu nhiệt *Saccharomyces cerevisiae* TH-30 phân lập từ chuối. Tạp chí Sinh học, 3: 7-11.
2. Nguyễn Lân Dũng, 1970. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 1. Nxb. KHKT. Hà Nội.
3. Sherman F., Fink O.R., Hick J.B., 1983. *Methods in Yeast Genetics*. New York: 61-66.
4. Stewart O.G., 1981. The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.* Vol 27: 973 - 990.
5. Zakharov I. A., Kojin C.A., Kojina T.H., 1976. Tuyển tập phương pháp nghiên cứu nấm men *Saccharomyces*. Nxb. Khoa học Leningrad. (Tiếng Nga).
6. Kosicov K. V., 1979. Các phương pháp di truyền chọn giống nấm men. Nxb. hoa học Leningrad (tiếng Nga).

## SUMMARY

### Heredity of some tolerant and biological Characters of the Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* TH-4 Isolated from mulberry Wine

By Le Đình Lương, Nguyễn Văn Hùng

Some hereditary characters, economically important, of the yeast strain used in wine production were undergone into investigation. It was shown that this 2n and well sporulating strain is heterozygous for thalium, alcohol tolerance (18%), biomass accumulation, thermoresistance (42 °C) and acid-tolerance (pH = 2). The obtained data also allow to suggest that thalium, alcohol tolerance and biomass accumulation is respectively controlled by one chromosomal gene and these genes are not linked to each other, meanwhile each of two characters thermoresistance and acid tolerance is controlled by at least two genes located on different chromosomes. A more detailed genetic analysis of above-mentioned characters is being carried out.

NGHIÊN CỨU SỰ KIỂM SOÁT DI TRUYỀN MỘT SỐ TÍNH TRẠNG  
CHỐNG CHỊU Ở NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae*

Nguyễn Văn Hưng, Lê Đình Lương  
Bộ môn Di truyền học  
Trường ĐHTH Hà nội

Trong các công bố trước đây /1,4,5/ chúng tôi đã thông báo những kết quả thu được khi điều tra đặc điểm di truyền học một số tính trạng chống chịu (chống chịu nhiệt-42°C, chống chịu cồn-14% (v/v) cồn, chống chịu axit-pH=2, chống chịu áp suất thẩm thấu cao-60% (v/v) glucose) ở một số nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Để tìm hiểu sâu hơn về sự kiểm soát di truyền của các tính trạng chống chịu này, chúng tôi đã chủ động tạo ra các nòi nấm men lai dị hợp tử về các tính trạng nói trên và phân tích đặc điểm di truyền của chúng ở nòi lai.

1. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP :

1. Các nòi nấm men : Phenotyp, genotyp và nguồn gốc của các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 : Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm

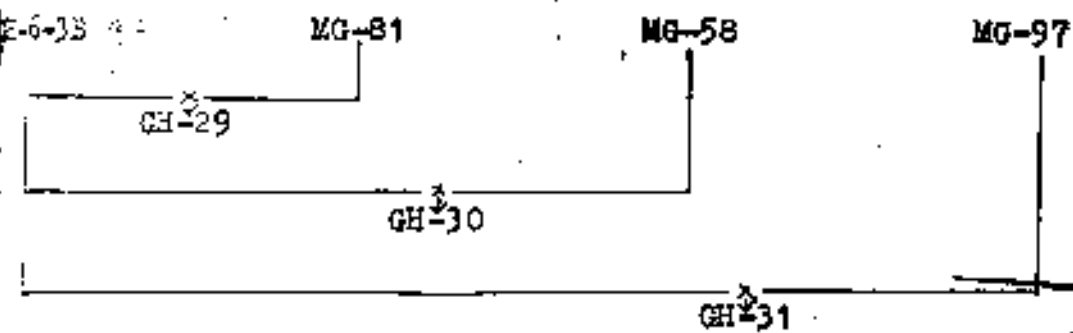
Số nòi	Nòi	Genotyp	Phenotyp	Nguồn gốc
1	MG-81	α odc19 tyr1 lys2 gal1 rad4 met14 ura1 gal2 lys9 pet8 ade2 gal5	His <sup>-</sup> { The <sup>-</sup> , Alc <sup>-</sup> , Aci <sup>-</sup> , Osm <sup>-</sup> , Mol <sup>-</sup>	Bộ sưu tập giống của Mortimer và phòng thí nghiệm di truyền phân tử Trường ĐHTH Leiden-Hà lan
2	MG-58	α leu2		
3	MG-97	α ade1 gal1 leu2 trp1 ura3 his2 odc4 leu1 arg4 his6 met14 asp5 lys7 pet17		
4	GH-6-3B		Mat <sup>+</sup> , The <sup>+</sup> , Alc <sup>+</sup> Aci <sup>+</sup> , Osm <sup>+</sup> , Mol <sup>+</sup>	Bộ môn Di truyền Trường ĐHTH Hà nội

Chú thích : The<sup>-</sup>: không mọc được ở 42°C, The<sup>+</sup> : mọc được ở 42°C.  
Alc<sup>-</sup> : không mọc được ở 14% (v/v) cồn, Alc<sup>+</sup> : mọc được ở 14% (v/v) cồn.  
Aci<sup>-</sup> : không mọc được ở pH=2, Aci<sup>+</sup> : mọc được ở pH=2. Osm<sup>-</sup> : không mọc được ở 60% glucose (w/v) glucose, Osm<sup>+</sup> : mọc được ở 60% (v/v) glucose.  
Mol<sup>-</sup> : không mọc được ở 28°Brix của ri đường, Mol<sup>+</sup> : mọc được ở 28°Brix của ri đường.

1. Môi trường và phương pháp : Sử dụng các môi trường và phương pháp đã được công bố trước đây /5,6,9/.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU :

1. Tạo nòi lai : Các nòi lai dị hợp tử về tính chịu nhiệt, chịu cồn, chịu axit, chịu áp suất thẩm thấu cao, chịu với nồng độ cao của rỉ đường được tạo ra như trong sơ đồ dưới đây :



2. Khả năng sinh bào tử và các tính trạng chống chịu của các nòi lai : Khả năng sinh bào tử là một tính chất quan trọng đối với vi nấm men được lựa chọn để tiến hành phân tích di truyền học. Các nòi lai được cấy lên môi trường sinh bào tử và sự hình thành bào tử được theo dõi trong 7 ngày. Tỷ lệ hình thành bào tử của các nòi GH-29, GH-30, GH-31 tương ứng là 82, 61, 87% (bảng 2).

Chúng tôi đã kiểm tra sự biểu hiện của các tính trạng chống chịu ở trạng thái dị hợp tử ở các nòi lai. Kết quả (bảng 2) cho thấy về tính chịu axit, tính chịu với áp suất thẩm thấu cao, tính chịu với độ-độ-độ-trong-rỉ nồng độ cao của rỉ đường thì cả 3 nòi lai đều có phenotyp giống với nòi cha mẹ GH-6-3B (mang phenotyp chống chịu) còn về tính chịu nhiệt, chịu cồn thì nòi lai GH-29 có phenotyp giống với nòi cha mẹ MG-81 (không mang phenotyp chống chịu, các nòi lai GH-30, GH-31 có phenotyp giống với nòi cha mẹ GH-6-3B (mang phenotyp chống chịu).

3. Đặc điểm di truyền học của các tính trạng chống chịu ở các nòi lai : Để tìm hiểu đặc điểm di truyền học của các tính trạng chống chịu ở các nòi lai dị hợp tử chúng tôi đã tiến hành phân tích bộ NST. Sau khi các giống sinh bào tử đã được xử lý dịch dạ dày 3c sên, chúng tôi sử dụng máy vi thao tác để tách các bào tử ra khỏi nang. Ở các nòi GH-29, GH-30, GH-31 đã tách tương ứng tổng số là 50, 57, 75 nang. Độ sống sót của các bào tử tương ứng là 90,0, 85,6, 84,7%.

Sau khi đã mọc tốt các thể phân ly (hình thành từ các bào tử) được nuôi cấy ở các điều kiện và trên các môi trường khác nhau

2 : Một số đặc điểm sinh học của các nòi lai GH-29, GH-30, GH-31

Nòi	Sinh bào tử (%)	42°C	14%(v/v) cồn	pH=2	60%(w/v) glucoza	28°Brix của ri đường
GH-29	82	-	-	+	+	+
GH-30	61	+	+	+	+	+
GH-31	87	+	+	+	+	+

Giải thích : + mọc , - không mọc .

Đã xét sự phân ly về các tính trạng chống chịu :

trên môi trường đủ ở 30, 38, 40 và 42°C để kiểm tra sự phân ly về tính chịu nhiệt .

ở 30°C trên :

môi trường chứa 10, 12, 14%(v/v) cồn

môi trường có pH= 5,5 ; = 3 ; = 2

môi trường có nồng độ glucoza 50, 60, 70% (w/v)

môi trường có nồng độ ri đường 24, 28, 32°Brix

để kiểm tra sự phân ly về tính chống chịu cồn, chống chịu axit, chống chịu áp suất thẩm thấu, chống chịu với nồng độ cao của ri đường .

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở cả 3 nòi lai GH-29, GH-30 và GH-31 đều không quan sát thấy sự phân ly về áp-suất-thẩm-thấu-cao về chống chịu với áp suất thẩm thấu cao và tính chống chịu với nồng độ cao của ri đường. Ở 50% glucoza hoặc ở 24°Brix của ri đường tất cả các thể phân ly mọc tốt sau 48 giờ nuôi cấy, ở 60% glucoza hoặc ở 28°Brix của ri đường tất cả các thể phân ly mọc tốt sau 72 giờ nuôi cấy và ở 70% glucoza hoặc ở 32°Brix của ri đường tất cả các thể phân ly mọc yếu hoặc không mọc sau 7 ngày theo dõi. Ngược lại, ở 42°C ; 14% (v/v) cồn; pH=2 đều quan sát thấy sự phân ly ở 3 nòi lai sau 72 giờ nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong các bảng 3, bảng 4, bảng 5 .

3: phân ly của các dấu chuẩn hóa sinh :

Các nòi lai GH-29, GH-30, GH-31 còn di hợp tử về một loạt các dấu chuẩn hóa sinh. Các dấu chuẩn này được đưa vào nòi lai nhằm mục đích phân tích tái tổ hợp di truyền. Để kiểm tra sự phân ly về các dấu chuẩn này các thể phân ly được đóng dấu lên các môi trường khác nhau. Toàn bộ kết quả của các thí nghiệm được trình bày trong các bảng 3, bảng 4, bảng 5 .

Biểu 3 : Phân tích bộ bốn ở nòi lai GH-29 .

Tính trạng	Kiểu bộ bốn				
	0 <sup>-</sup> :4 <sup>+</sup>	1 <sup>-</sup> :3 <sup>+</sup>	2 <sup>-</sup> :2 <sup>+</sup>	3 <sup>-</sup> :1 <sup>+</sup>	4 <sup>-</sup> :0 <sup>+</sup>
The	4	10	9	5	3
Alc	5	6	20	2	0
Acđ	0	1	12	10	12
Met	0	0	2	14	16
Tyr	0	0	1	8	23
Lys	0	2	9	14	7
Ura	0	0	11	10	11
Ade	0	7	19	5	1

Biểu thích : + mọc , - không mọc .

Biểu 4 : Phân tích bộ bốn ở nòi lai GH-30 .

Tính trạng	Kiểu bộ bốn				
	0 <sup>-</sup> :4 <sup>+</sup>	1 <sup>-</sup> :3 <sup>+</sup>	2 <sup>-</sup> :2 <sup>+</sup>	3 <sup>-</sup> :1 <sup>+</sup>	4 <sup>-</sup> :0 <sup>+</sup>
The	0	2	5	13	20
Alc	0	3	7	15	15
Acđ	0	0	4	6	22
Met	0	2	4	19	18
Leu	0	2	10	13	19
His	0	1	3	25	14

Biểu thích : + mọc , - không mọc .

Biểu 5 : Phân tích bộ bốn ở nòi lai GH-31

Tính trạng	Kiểu bộ bốn				
	0 <sup>-</sup> :4 <sup>+</sup>	1 <sup>-</sup> :3 <sup>+</sup>	2 <sup>-</sup> :2 <sup>+</sup>	3 <sup>-</sup> :1 <sup>+</sup>	4 <sup>-</sup> :0 <sup>+</sup>
The	0	4	27	12	6
Alc	6	4	6	26	14
Acđ	12	12	19	16	7
Met	0	2	6	19	30
Ade	3	3	21	25	15
Leu	3	7	38	17	2
Trp	1	4	14	26	22
Ura	1	3	13	34	16
Arg	0	2	12	33	20
His	3	7	26	25	6
Asp	0	3	14	33	17
Lys	0	3	11	33	20

Biểu thích : + mọc , - không mọc .

## III. THẢO LUẬN :

1. Theo sơ đồ tạc nòi lai có thể nhận thấy nòi GH-6-3B có khả năng giao phối được với cả nòi mang giới tính  $\alpha$  (nòi MG-81 và MG-58) và nòi mang giới tính  $\beta$  (nòi MG-97). Như vậy ở nòi GH-6-3B có sự hoạt động của gen đồng dị tần /2,3,6,7/.

2. Khả năng hình thành bào tử tốt và tỷ lệ sống sót cao của các bào tử tách ra từ mỗi nang là điều kiện cần thiết để áp dụng phương pháp phân tích bộ bốn. Cả 3 nòi lai GH-29, GH-30 và GH-31 đều có tỷ lệ hình thành bào tử cao (tương ứng là 82; 61; 87%) sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường sinh bào tử, đồng thời các bào tử tách ra từ chúng cũng có tỷ lệ sống sót cao (tương ứng là 90,0 ; 83,6 ; 84,7%). Các kết quả này cho phép tiến hành các thí nghiệm phân tích di truyền học ở các nòi lai. Thường thường sự tăng khả năng sống, khả năng sinh bào tử và độ hữu thụ ở nòi lai là do kết quả của ưu thế lai /7/.

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của các tính trạng chống chịu ở trạng thái dị hợp tử cho thấy (bảng 2) tính chịu axit ( $pH=2$ ), tính chịu áp suất thẩm thấu cao (60% [w/v] glucose) và tính chịu với nồng độ cao của ri đường ( $28^{\circ} Brix$ ) là các tính trạng trội. Trong khi đó tính chịu nhiệt ( $42^{\circ}C$ ), tính chịu cồn (14% [v/v] cồn) có kiểu di truyền phức tạp. Ở nòi lai GH-29 chúng được biểu hiện như là dấu hiệu lặn (không thể hiện ở trạng thái dị hợp tử), còn ở các nòi lai GH-30, GH-31 chúng lại được biểu hiện như là dấu hiệu trội (thể hiện ở trạng thái dị hợp tử). Như vậy 2 tính trạng này có thể là do các gen trội không bền vững kiểm soát, điều đó có nghĩa là cũng là một gen nhưng trong những điều kiện môi trường ngoài và genotyp khác nhau chúng sẽ có biểu hiện khi thì trội, khi thì lặn.

3. Ba nòi lai đã được đem phân tích đặc điểm di truyền học của các tính trạng chống chịu bằng phương pháp phân tích bộ bốn.

Trong phân tích bộ bốn các tỷ số phân ly nhận được là biểu hiện của quy luật hoạt động của các nhiễm sắc thể trong giảm phân. Thực chất của phép phân tích bộ bốn là hiện tượng phân ly được xét ngay trong mỗi nang thông qua phenotyp của các bào tử trong nang. Dựa vào tính chất của khuẩn lạc sinh ra từ bào tử có thể kết luận về genotyp của bào tử. Trong phân tích bộ bốn nếu như tính trạng được xác định bởi các gen nằm trên nhiễm sắc thể thì khi tạo thành bộ bốn sẽ xảy ra hiện tượng phân ly tính trạng. Khi nhận tổ xác định tính trạng nằm trong các cấu trúc tế bào chất thì sự di truyền của tính trạng sẽ khác đi. Nếu như nhiều lần giao

hai dạng cha mẹ khác nhau mà phân tích bộ bốn luôn cho tỷ số (nghĩa là không có phân ly) thì ở đây có thể có hiện tượng đi qua tế bào chất. Tỷ số 4:0 cũng còn có thể nhận được nếu như trạng được xác định bởi nhiều gen. Trong trường hợp này khi lai lần thứ hai hay lần thứ ba với dạng cha mẹ mang tính trạng lặn, tính phải xảy ra hiện tượng phân ly tính trạng. Còn nếu là đi qua tế bào chất thì dù lai ngược nhiều lần như thế cũng không có sự phân ly này /2,3/. Như vậy bằng phép phân tích bộ bốn ta có thể biết được tính trạng được kiểm soát bởi các gen trong hay bởi các gen trong tế bào chất và tính trạng được kiểm soát bởi gen hay nhiều gen.

Kết quả phân tích bộ bốn cho thấy không có hiện tượng phân ly tính trạng chống chịu với áp suất thẩm thấu cao (60% [w/v] sac), với nồng độ cao của rỉ đường (26°Brix) và mặc dù chúng tôi đã hành lai trở lại nhiều lần với dạng cha mẹ mang tính trạng lặn (là các nòi MG-81, MG-58, MG-97) nhưng vẫn không quan sát thấy sự phân ly trong giảm phân. Như vậy các tính trạng này là do các gen trội trong các cấu trúc tế bào chất kiểm soát.

Ngược lại với 2 tính trạng kể trên, các tính trạng chịu nhiệt độ cao (42°C), chịu nồng độ cồn cao (14% [v/v] cồn), chịu axit là do các gen nằm trong nhân kiểm soát. Ở cả 3 nòi chúng tôi quan sát thấy sự phân ly của 3 tính trạng này trong giảm phân (3,4,5). Thí dụ đối với nòi GH-29 ở 42°C có sự phân ly như sau: trong số 31 nang đem kiểm tra có 3 nang phân ly theo kiểu 4<sup>-</sup>:0<sup>+</sup> chiếm 9,7%; 5 nang phân ly theo kiểu 3<sup>-</sup>:1<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 16,1%; 9 nang phân ly theo kiểu 2<sup>-</sup>:2<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 29,0%; 10 nang phân ly theo kiểu 1<sup>-</sup>:3<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 32,3% và 4 nang phân ly theo kiểu 0<sup>-</sup>:4<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 12,9%. Ở 14% (v/v) cồn có sự phân ly như sau: trong số 33 nang đem kiểm tra có 2 nang phân ly theo kiểu 3<sup>-</sup>:1<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 6,1%; 20 nang phân ly theo kiểu 2<sup>-</sup>:2<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 60,5%; 6 nang phân ly theo kiểu 1<sup>-</sup>:3<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 18,2% và 5 nang phân ly theo kiểu 0<sup>-</sup>:4<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 15,2%. Ở pH = 2 có sự phân ly như sau: trong số 35 nang đem kiểm tra có 12 nang phân ly theo kiểu 4<sup>-</sup>:0<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 34,3%; 10 nang phân ly theo kiểu 3<sup>-</sup>:1<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 28,6%; 12 nang phân ly theo kiểu 2<sup>-</sup>:2<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 34,3% và 1 nang phân ly theo kiểu 1<sup>-</sup>:3<sup>+</sup> chiếm tỷ lệ 2,8% (bảng 3). Phép thống kê toán học (phép  $\chi^2$ ) cho thấy sự phân ly của 3 tính trạng này đều lệch khỏi tỷ số 2:2, là tỷ số lý thuyết dự định đối với tính trạng được quy định bởi một gen nằm trong nhân thể lưỡng bội dị hợp tử.

Tương tự ở các nòi lai GH-30 và GH-31 phép thống kê toán học

phép  $\chi^2$ ) cũng cho thấy sự phân ly về 3 tính trạng : — chịu  
 nhiệt, chịu cồn và chịu axit lệch khỏi tỷ số phân ly 2:2  
 trong mỗi bộ bốn .

Các tỷ số phân ly lệch lạc này có thể do một số nguyên nhân  
 gây nên, chẳng hạn như do tính trạng được quy định bởi nhiều gen,  
 do do gen quy định tính trạng liên kết với gen gây chết, hoặc do  
 có mức bội thể đa bội, lệch bội /3,7/. Trong trường hợp cụ thể  
 ít nhất có thể kết luận chắc chắn là do tính đa bội hoặc lệch bội  
 gây ra. Điều này có thể thấy rõ khi xem xét sự phân ly của các dấu  
 chuẩn hóa sinh

Cả 3 nòi lai không những dị hợp tử về các tính trạng chống chịu  
 còn dị hợp tử về nhiều dấu chuẩn hóa sinh (theo genotyp của các  
 bố mẹ được nêu trong bảng 1 ). Nòi GH-29 dị hợp tử về các gen  
 met, tyr, lys, ura, ade. Nòi GH-30 dị hợp tử về các gen met, leu, his.  
 Nòi GH-31 dị hợp tử về các gen met, ade, leu, trp, ura, arg, his, asp.  
 Tất cả các gen này đã được nghiên cứu kỹ và đã được định vị ở  
 trên bản đồ nhiễm sắc thể của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* /8/.  
 Các tính trạng (đột biến hóa sinh) nói trên đều được quy định bởi một  
 gen, như vậy trong phân tích bộ bốn sẽ phải luôn luôn nhận được tỷ  
 số phân ly 2:2 trong mỗi bộ bốn. Phép thống kê toán học (phép  $\chi^2$ )  
 cho thấy sự phân ly của các dấu chuẩn này đều lệch khỏi tỷ số 2:2 ở  
 3 nòi lai GH-29, GH-30 và GH-31. Kết quả này chỉ có thể là do  
 tính đa bội hoặc lệch bội của nòi lai gây ra .

**KẾT LUẬN :**

1. Các nòi nấm men lai *Saccharomyces cerevisiae* GH-29, GH-30 và  
 GH-31 có khả năng sinh bào tử tốt, có độ sống sót của các bào tử  
 tách từ-mỗi-nang-ra-tương-đối-cao ra từ mỗi nang cao, đủ để tiến  
 hành các thí nghiệm phân tích di truyền học. Chúng có mức bội  
 thể đa bội hoặc lệch bội .
2. Tính trạng chống chịu với áp suất thẩm thấu cao (60% [v/v] glucose)  
 tính trạng chống chịu với nồng độ cao của rỉ đường (28°Brix) là  
 do các gen trội nằm trong các cấu trúc tế bào chất kiểm soát .
3. Tính trạng chống chịu axit ( pH=2 ) là do các gen trội nằm trong  
 nhân kiểm soát .
4. Tính trạng chống chịu với nhiệt độ cao (42°C), tính trạng chống  
 chịu với nồng độ cồn cao ( 14% [v/v] cồn) là do các gen trong  
 nhân kiểm soát.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm, Lê Đình Lương. 1987. điều tra sinh học nòi nấm men chịu nhiệt *Saccharomyces cerevisiae* TH-30 phân lập từ chuối. Tạp chí Sinh học . Tập 9 .Số 3. tr .7 .
- Nguyễn Lân Dũng, Bùi Xuân Đồng, Lê Đình Lương. 1982. Vi nấm . Nxb Khoa học kỹ thuật . Hà nội .
- Lê Đình Lương. 1970. Di truyền học vi sinh vật . Trường ĐHTH Hà nội.
- Lê Đình Lương, Nguyễn Văn Hưng, Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm . 1988. Genetic control of some tolerant characteries in *Saccharomyces cerevisiae* . Genome . 30 . : . 488 .
- Lê Đình Lương, Nguyễn Văn Hưng. 1988. Đặc điểm di truyền học của một số tính trạng chống chịu ở nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TH-4 phân lập từ rượu vang dâu . Thông tin các trường đại học . Số 2 . tr .46 .
- Закоров . И. А., Кожух . С. А., Кожуха . Т. Н., Пегопова . И. В. 1976. Сборник методик по генетике грибов-сахаромицетов. Л., « Наука ».
- Касиков . К. В. 1979. Генетические методы селекции грибов. Москва . « Наука ».
- Mortimer, R.K., and Schild , D. 1980 . Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae* . Microbiol. Rev. Vol.4.No.4. p.519 .
- Sherman, F., G.R.Pink and J.B.Hicks .1983 . Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York .

### STUDY OF GENETIC CONTROL OF TOLERANT CHARACTERS

#### IN *Saccharomyces cerevisiae*

Nguyễn Văn Hưng, Lê Đình Lương

Dept. of Genetics

University of Hanoi.

#### Summary

3 hybrid yeast strains *S. cerevisiae* GH-29, GH-30, GH-31 which are heterozygous for thermotolerance (42°C), alcoholic resistance (14% v/v ethanol), acid resistance (pH = 2), osmotic resistance (60% w/v glucose) and molasse resistance (28° Brix of molasse) were undertaken for tetrad analysis.

It was shown that osmotic and molasse resistance were controlled by dominant genes located in cytoplasmic structures. Meanwhile acid resistance was controlled by dominant genes located in chromosomes, thermotolerance and alcoholic resistance were controlled by genes located in chromosomes. Strains GH-29, GH-30, GH-31 might be polyploid or aneuploid.

# CÁC NỒI NẤM MEN LẠI MỚI DÙNG CHO SẢN XUẤT BÁNH MÌ VÀ LÊN MEN RƯỢU

LE THANH LAM, NGUYEN THI MUI  
LE DINH LUONG  
Bộ môn Di truyền - Trường Đại học  
Tổng hợp Hà Nội

## I - MỞ ĐẦU

Vào lai nấm men, cũng giống như đối với bất kỳ hình vật nào khác, được tiến hành theo những mục đích khác nhau. Người ta tạo ra nó để sử dụng vào sản xuất trong trường hợp trước kết hợp các tính trạng quý giá ở cha mẹ vào thế lai hoặc khi thế lai có biểu hiện ưu thế lai. Trong nghiên cứu, người ta dùng đến lai khi cần xác định đặc điểm di truyền của một tính trạng nào đấy; tính trạng đó được qui định bởi nhân tố di truyền nằm ở nhân hay tế bào chất, nó phụ thuộc vào một gen hay nhiều gen. Người ta phân tích sự phân ly của những tính trạng di truyền, để ràng ở thế hệ con của các thế lai và dựa vào đó để biết cấu trúc của bộ máy di truyền của tế bào (1).

Các phương pháp thu nhận "con lai" và nghiên cứu sự phân ly ở thế hệ sau của chúng được xác định bởi các đặc điểm của chu trình sống của chính cơ thể được nghiên cứu. Có thể dễ dàng thực hiện phép lai giữa các loài nấm men dị tính. Nhưng để số các thế hệ được sử dụng trong sản xuất lại là các loài nấm men đồng tính. Vì vậy, để có con lai tốt dùng cho sản xuất bánh mì và lên men rượu, tốt nhất là thực hiện phép lai bằng máy vi thao tác. Nghĩa là dùng máy vi thao tác để ghép các bào tử của các nòi khác nhau thành từng cặp riêng rẽ trên mặt thạch và theo dõi cho đến khi chúng kết, lên với nhau thành hợp tử hình để cấy hay hình quả tạ kép. Những hợp tử thu được bằng cách này chắc chắn là con lai. Dùng máy vi thao tác, chúng tôi đã thu được con lai vừa có khả năng tích lũy sinh khối cao (đặc điểm của nòi 220) vừa có khả năng tạo ra nhiều maltose (đặc điểm của nòi MN) (bảng 2).

## II - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

a. Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm.  
Bảng 1: Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm.

STT	Tên nòi	Nguồn gốc
1	TH30	Trung tâm vi sinh vật ứng dụng
2	220	"
3	MN	"
4	ĐN	Nhà máy thực phẩm Đà Nẵng
5	TM	Nhà máy bánh mì Trưng Mai Hà Nội
6	HL	Nấm men thương phẩm của Hà Nội
7	TP	Viện công nghiệp thực phẩm Hà Nội

khả năng tăng trưởng và phương pháp lai theo I. A. Zakharov et al (2)

Xác định khả năng lên men đường (độ tích lũy  $CO_2$  được sinh ra) bằng bình Shmirnoff. Xác định khả năng tích lũy sinh khối bằng cách đo độ đục của các nòi sau khi nuôi cấy (xác định OD ở bước sóng 630nm). Xác định khả năng lên men rượu trong dịch rỉ đường bằng phương pháp so sánh trọng lượng bình lên men trước và sau khi lên men (theo Alcohol handbook)

## III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 2: Khả năng lên men đường và tích lũy sinh khối của các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm.

STT	Nòi	Khả năng lên men đường		Khả năng tích lũy sinh khối (OD) ở 630nm
		Saccharose ( $cmCO_2/6h$ )	Maltose ( $cmCO_2/6h$ )	
1	TH30	6,5	0	0,12
2	220	7,0	0	0,14
3	MN	5,5	4,0	0,10
4	ĐN	4,0	0	0,10
5	TM	5,0	3,0	0,10
6	HL	5,0	3,0	0,10

thành tạo ra nếm men lại tốt hơn, dùng để sản xuất bánh mì và lên men rượu, chúng tôi đã dùng những nòi đang được sử dụng phổ biến ở Việt Nam làm cha mẹ. Chúng chỉ tiêu sản xuất chủ yếu của chúng được trình bày ở bảng 2.

Thêm vào đó, nhằm chọn lọc nòi men hơn - khỏe mạnh, chúng tôi cũng đã dùng những nòi cũng mang các khả năng sống sót của các bào tử tách ra từ mỗi nạng của các nòi. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Khả năng sống sót của các bào tử tách ra từ mỗi nạng của các nòi dùng trong thí nghiệm.

STT	Nòi	Tỉ số phân li trong một nạng (Sống : Chết)					Tổng số nạng
		4 : 0 (+ : -)	3 : 1 (+ : -)	2 : 2 (+ : -)	1 : 3 (+ : -)	0 : 4 (+ : -)	
1	TH30 (% sống sót)	50	11	4	0	0	65
		76,92	16,29	6,16	0	0	100
2	202 %	14	0	0	0	0	14
		100	0	0	0	0	100
3	TM %	0	8	1	0	5	14
		0	57,14	7,14	0	35,7	100
4	HL %	1	3	4	4	0	12
		8,33	25,0	33,3	33,3	0	100
5	MN %	1	6	4	2	1	14
		7,1	42,6	28,4	14,2	7,1	100

Qua bảng 1 và 2 ta thấy rằng, nòi 220 có những ưu điểm là lên men đường Saccharose tốt, tích lũy sinh khối nhiều và khỏe mạnh, nhưng lại có nhược điểm là không lên men đường fructose. Hoạt tính wardenza là một chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá chất lượng men bánh mì (3). Vì vậy, chúng tôi đã dùng các nòi MN, TM, HL là những nòi có hoạt tính Maltase làm dạng cha mẹ thứ 2, nhằm thu được con lai có các ưu điểm của cả hai dạng cha mẹ.

thực và theo dõi cho đến khi phát hiện được các hợp tử. Nòi DN không sinh bào tử nên chúng tôi dùng tế bào sinh dưỡng của nó để ghép cặp với bào tử của các nòi khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Chúng tôi đã cấy mỗi nếm men lên môi trường sinh bào tử, sau đó xếp li giống sinh bào tử bằng dịch đã tẩy ôc sên đã pha vô khuẩn, tách lấy các bào tử đơn bào, ghép chúng thành từng cặp trên mặt

Qua bảng 4 ta thấy rằng, không thu được con lai với nòi DN. Điều đó có thể là do sự không phù hợp về sinh lí giữa các tế bào sinh dưỡng của nòi DN và bào tử của các nòi khác; cũng có thể do sự sai khác về mức độ bội thể của chúng. Chúng tôi thấy chúng này mềm riêng rẽ mà không được hợp được với nhau. Điều đó cũng xảy ra đối với cả nòi TH30. Chấn chấn của các nòi, những nguyên nhân khác mà chúng tôi chưa số, số 41 có ít số cặp lai của 220 với TH30 và HL là vì, bằng mắt thường chúng tôi không thấy các hợp tử có kích thước khuẩn lạc lớn hơn so với các khuẩn lạc không phải là hợp tử. Cũng bằng mắt thường, chúng tôi thấy các hợp tử của phép lai 220/MN có kích thước khuẩn lạc lớn hơn, nên chúng tôi ghép nhiều cặp hơn với hi vọng chọn nhanh được nòi lai tốt. Nhờ vậy, chúng tôi đã chọn ngay được 2 nòi H17 và H14 và tiến hành so sánh giữa các con lai và cha mẹ chúng về những chỉ tiêu quan trọng liên quan đến sản xuất bánh mì. Kết quả được trình bày ở bảng 5. Qua bảng 5 ta thấy các nòi lai H14 và H15 đều có các chỉ tiêu

Bảng 4: Kết quả của những phép lai bằng máy vi thao tác.

STT	Cha mẹ	Số cặp	Số con lai thu được	Tỉ lệ%
1	220/HL	30	2	6,6
2	220/TM	30	1	3,3
3	220/TH30	115	0	0
4	220/DN	115	0	0
5	220/MN	60	12	20
6	DN/TH30	115	0	0

thấy các hợp tử có kích thước khuẩn lạc lớn hơn so với các khuẩn lạc không phải là hợp tử. Cũng bằng mắt thường, chúng tôi thấy các hợp tử của phép lai 220/MN có kích thước khuẩn lạc lớn hơn, nên chúng tôi ghép nhiều cặp hơn với hi vọng chọn nhanh được nòi lai tốt. Nhờ vậy, chúng tôi đã chọn ngay được 2 nòi H17 và H14 và tiến hành so sánh giữa các con lai và cha mẹ chúng về những chỉ tiêu quan trọng liên quan đến sản xuất bánh mì. Kết quả được trình bày ở bảng 5. Qua bảng 5 ta thấy các nòi lai H14 và H15 đều có các chỉ tiêu

thấp hơn hoặc bằng với cha mẹ chúng. Trong khi đó thì các nòi lai H17 và H44 có các chỉ tiêu vượt hơn hẳn so với cha mẹ chúng. Như vậy, các nòi nấm men H17 và H44 là những nòi lai tốt. Chúng đã được sử dụng để sản xuất thử tại nhà máy bánh mì Trương Mai Hà nổi và được đánh giá là nòi nấm men tốt.

Bảng 5: So sánh khả năng tích lũy sinh khối và lên men đường giữa các nòi lai và cha mẹ chúng.

STT	Nòi	Cha mẹ	Sinh khối OD	Khả năng lên men đường	
				Saccharose cm CO <sub>2</sub> /6h	Maltose cm CO <sub>2</sub> /6h
1	220		0,22	6,0	0
2	MN		0,18	5,0	6,0
3	H17	220/MN	0,25	7,0	7,0
4	H44		0,26	7,5	7,5
5	HL		0,18	5,5	5,0
6	TM		0,17	5,5	5,0
7	H14	220/TM	0,17	5,5	5,5
8	H15	220/HL	0,18	5,5	5,5

Rõ ràng là khả năng lên men đường Saccharose của các nòi H17 và H44 cũng khá tốt. Vì vậy, chúng tôi đã thử so sánh khả năng lên men rượu ở nòi đường sữa chúng và hai nòi nấm men đang được sử dụng trong sản xuất rượu ở nhà máy thực phẩm Đà Nẵng và xí nghiệp chế biến đường Sơn Đông, Hoà Bình, Hà Nội. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Hiệu quả đáng chú ý ở chỗ thấy là có thể tiếp tục nghiên cứu kỹ các điều kiện khác nữa để có thể thấy thử các nòi đang sử dụng trong sản xuất đường các nòi lai, nhằm thu được nhiều sản phẩm hơn.

Như ta đã biết, nấm men có vai trò quan trọng không những trong đời sống hàng ngày của con người mà còn là một công cụ tốt trong

Bảng 6: Khả năng lên men rượu bằng ri đường của các nòi nấm men.

STT	Nòi	Rượu trong dịch lên men (%)	
		Nồng độ ri đường 22 độ	Nồng độ ri đường 27 độ
1	ĐN	9	10
2	TP	8,7	10,5
3	H17	9	11
4	H44	9,4	11,5

các lĩnh vực nghiên cứu khác nhau của Sinh học. Hiện nay và tương lai, nấm men ngày càng có nhiều đóng góp không thể thay thế được trong lĩnh vực sinh học phân tử nói chung và trong công nghệ sinh học nói chung. Chính vậy, các nhà di truyền chọn giống nấm men không ngừng chọn lọc một cách cẩn thận những nòi tốt có sẵn trong tự nhiên; đồng thời cũng tiến hành lai và đã thu được những con lai có ưu thế lai hoặc kết hợp được những đặc tính quý báu của các nòi khác nhau. Những nòi lai đó đã được sử dụng ở qui mô công nghiệp để sản xuất: rượu, bia, bánh mì (2, 3, 4). Điều kiện thiên nhiên Việt Nam rất đa dạng, phong phú. Các loại sinh vật nói chung và nấm men nói riêng cũng đa dạng phong phú. Bằng cách chọn lọc và lai, chúng ta sẽ có ngày càng nhiều nòi nấm men tốt cho sản xuất.

Công trình này được tiến hành trong khuôn khổ của kinh phí đề tài cấp nhà nước 52 D-01-10, và đề tài VHS-D. Chúng tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ của đồng chí Trần Thị Nhuận trong việc chuẩn bị dụng cụ và môi trường cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zakharov I. A. et al. Nxb K. H. Leningrad 1976 (tiếng Nga)
2. Kocikov K. V. Nxb. K. H. Matxcova 197 (tiếng Nga)
3. Kocikov K. V. Nxb. K. H. Matxcova 185 (tiếng Nga)
4. Robert E. Krieger Publishing Company. I. hington New York. 1977.

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG MỘT SỐ NÒI NẤM MEN LAI  
TRONG VIỆC SẢN XUẤT CỒN

Nguyễn Văn Hưng, Dương Văn Hợp,  
Lê Đình Lương.  
Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.

Từ trước đến nay cồn là nguồn nguyên liệu rất quan trọng trong đời sống con người. Nó được sử dụng dưới nhiều hình thức khác nhau trong y tế, trong công nghiệp và dùng làm thực phẩm... Từ rất lâu con người đã biết sản xuất ra các loại đồ uống alcohol. Cồn chắt dốt đã được sản xuất ở Brazil từ năm 1933. Đức và Nhật cũng sử dụng cồn như một nguồn chất dốt trong thời kỳ chiến tranh thế giới thứ II (1939-1945). Hiện nay do sự tăng giá chất dốt trong phạm vi toàn thế giới (giá than đá tăng hơn 50%, giá khí tự nhiên tăng gấp đôi và giá các sản phẩm dầu mỏ nói chung đang lên phất) làm cho người ta bắt đầu quan tâm trở lại đối với việc sản xuất cồn nhiên liệu từ các nguồn phế liệu sinh học như rỉ đường, mùn cưa, rơm rạ.../10,11/.

Hiện nay ở nước ta việc sản xuất cồn còn gặp nhiều khó khăn, do Việt nam là một nước nhiệt đới có nhiều tháng nóng trong năm; chúng ta lại chưa có được những trang thiết bị hiện đại cho phép duy trì được nhiệt độ ổn định trong suốt quá trình sản xuất. Bên cạnh đó chúng ta chưa có những giống chủng tốt (mang các tính trạng chống chịu và các tính trạng kinh tế) phục vụ cho mục đích này.

Nhằm tạo ra các nòi nấm men mới dùng trong công nghiệp sản xuất cồn, trong những năm vừa qua chúng tôi đã tiến hành lai hữu tính các nòi nấm men khác nhau có nguồn gốc Việt nam hay nhập nội /1/. Sau khi thu được, các nòi nấm men lai được kiểm tra sơ bộ về các đặc tính sinh học như khả năng tích lũy sinh khối trên môi trường glucose, sacarose; khả năng lên men sacarose, hoạt tính mentaza, tính chống chịu với nhiệt độ cao (42°C), tính chống chịu với nồng độ cồn cao (14% [v/v] ethanol), tính chống chịu axit (pH=2), tính chống chịu với áp suất thẩm thấu cao (60% [w/v] glucose), tính chống chịu với nồng độ cao của rỉ đường (28°Brix của rỉ đường). Tiếp theo, tùy thuộc vào các đặc tính sinh học chúng sẽ tiếp tục được thử nghiệm vào từng mục đích cụ thể. Trong bài báo này sẽ giới thiệu những kết quả nghiên cứu khả năng ứng dụng 3 nòi nấm men lai GH-44, GH-191, GH-142 trong việc sản xuất

Đn. Chúng được so sánh với 2 nòi nấm men ĐH, TP đang được dùng trong sản xuất cồn ở nước ta.

NGUYỄN LIÊU VÀ PHƯƠNG PHÁP :

Các nòi nấm men : Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1 : Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm

Số TT	Nòi	Đặc điểm sinh học	Nguồn gốc
1	ĐH	Chịu nhiệt ( $42^{\circ}\text{C}$ ), chịu cồn (14%), chịu axit ( $\text{pH} = 2$ ), chịu áp suất thẩm thấu cao (60% glucose), chịu nồng độ cao của rỉ đường ( $28^{\circ}\text{Brix}$ ), tích lũy sinh khối tốt, lên men sacarozơ tốt, hoạt tính mantaza yếu, không sinh bào tử.	Nhà máy chế phẩm Vi sinh Đà Nẵng.
2	GH-142	Giống nòi ĐH, nhưng sinh bào tử tốt.	Bộ môn Di truyền, ĐHTH
3	GH-191	- nt -	Hà Nội.
4	GH-44	Chịu nhiệt kém hơn ( $40^{\circ}\text{C}$ ), chịu cồn kém hơn (12%), chịu áp suất thẩm thấu cao (60% glucose), chống chịu với nồng độ cao của rỉ đường ( $28^{\circ}\text{Brix}$ ), tích lũy sinh khối tốt, lên men sacarozơ tốt, hoạt tính mantaza tốt, sinh bào tử tốt.	Viện Công nghiệp thực phẩm Hà Nội.
5	TP	Giống nòi GH-44, nhưng tích lũy sinh khối yếu hơn, hoạt tính mantaza yếu.	Viện Công nghiệp thực phẩm Hà Nội.

Môi trường và phương pháp :

Môi trường :

Môi trường lên men glucose-cao nấm men :

Cao nấm men	1 g
Glucose	180 g
Nước cất	1000 ml

Môi trường lên men rỉ đường :

Rỉ đường $18^{\circ}\text{Brix}$	1000 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
$\text{pH} = 6$	

Các môi trường khác có thành phần như đã được công bố trong tài liệu trước đây /3/.

b. Phương pháp :

Xác định trọng lượng sinh khối : Dịch huyền phù tế bào sau khi nuôi cấy được ly tâm (1500 vòng/phút trong 20 phút), loại bỏ dịch trên cạn, cân tính trọng lượng tươi (g/l).

Xác định hàm lượng glucose và hàm lượng cồn trong quá trình lên men : Sử dụng phương pháp đo Tia hồng ngoại J.P. van Dijken (Bộ môn Vi sinh học và Enzim học, trường DETH và Công nghệ Delft-Hà Lan) và kỹ sư H.J.G. ten Hoopen (Bộ môn Kỹ nghệ sinh hóa học, trường DETH và Công nghệ Delft-Hà Lan) giới thiệu. Lấy 50  $\mu$ l mẫu (đã loại bỏ tế bào nấm men, chứa không quá 0,9  $\mu$ g glucose/l hoặc chứa không quá 200  $\mu$ g cồn/l) trộn vào trong ml hỗn dịch enzym kiểm nghiệm (tương ứng cho việc xác định hàm lượng glucose hoặc cồn). Để hỗn dịch reag 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó đo mật độ quang của phản ứng màu ở bước sóng 510 nm trên máy Colorimeter B4. Kết quả được đối chiếu với đường chuẩn 'nồng độ glucose phụ thuộc mật độ quang' và 'nồng độ cồn phụ thuộc mật độ quang'.

Xác định hàm lượng cồn bằng chưng cất : Sau khi lên men, cất cồn và xác định cồn bằng cồn kế.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN :

1. Khả năng tích lũy sinh khối : Mặc dù từng nòi nấm men cụ thể có thể được dùng cho từng mục đích kinh tế khác nhau (sản xuất bánh mì, sản xuất cồn, sản xuất rượu vang và đồ giải khát, sản xuất các chế phẩm giàu protein và vitamin, sản xuất thức ăn gia súc...), nhưng khả năng tích lũy sinh khối cao là một đặc tính chung cần thiết đối với chúng. Bởi vì những nòi nào có chỉ tiêu này cao thì trên cùng một đơn vị môi trường sẽ thu được nhiều sản phẩm và như vậy sẽ làm tăng hiệu quả kinh tế.

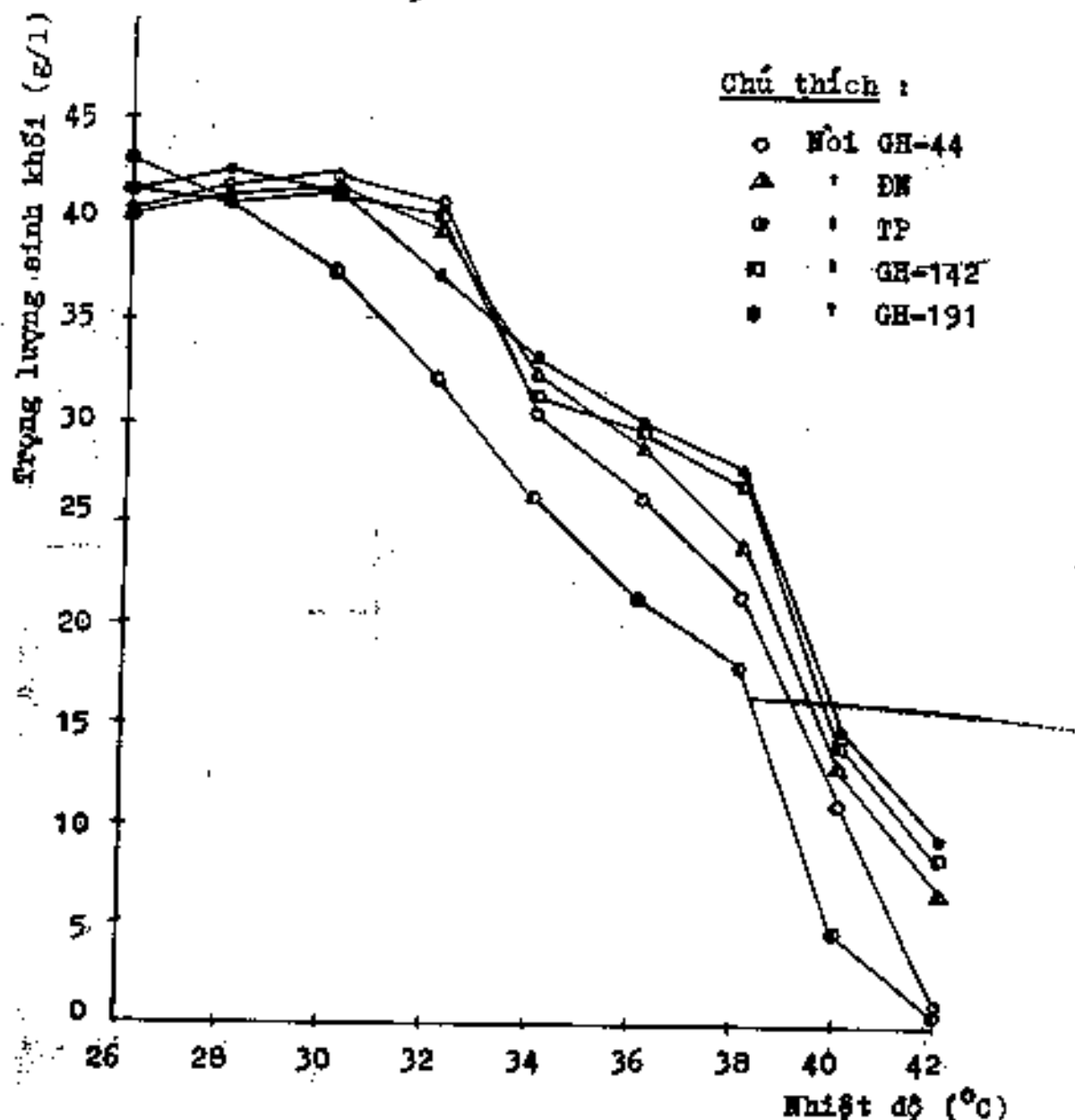
Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của nấm men. Ở 43°C người ta không quan sát thấy sự phân chia của tế bào nấm men nữa /4/. Trong thực tế sản xuất ở nước ta, nhiều cơ sở sản xuất chưa có điều kiện tự động hóa khâu điều chỉnh nhiệt độ. Vì vậy trước hết các nòi lai được kiểm tra về khả năng tích lũy sinh khối trên môi trường ri đường (môi trường sản xuất) ở các nhiệt độ khác nhau từ 26°C đến 42°C.

Trên hình 1 mô tả sự thay đổi trọng lượng sinh khối (g/l) của các nòi theo nhiệt độ nuôi cấy. Ở đây cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 26 đến 30°C các nòi chia thành 3 kiểu tích lũy sinh khối : a/ tăng sự tích lũy sinh khối (nòi GH-44 tăng từ 40,0 g/l ở 26°C lên 42,3 g/l ở 30°C ; b/ giảm sự tích lũy sinh khối (nòi TP giảm từ 42,6 g/l xuống 36,8 g/l); c/ sự tích lũy sinh khối gần như không thay đổi (gồm các nòi ĐN, GH-142, GH-191), thí dụ nòi ĐN có trọng lượng sinh khối ở 26°C là 41,7 g/l và ở 30°C là 42,2 g/l, nòi GH-191 có trọng lượng sinh khối ở 26°C là 40,1 g/l và ở 30°C là 41,7 g/l. Các kết quả trên đây cho thấy đối với nòi GH-44 nhiệt độ < 30°C và đối với nòi TP nhiệt độ > 26°C là không tối ưu cho sự sinh trưởng, còn đối với các nòi ĐN, GH-142, GH-191 khoảng nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 26-30°C.

Khi nhiệt độ tăng từ 30 đến 42°C nhìn chung các nòi đều giảm sự tích lũy sinh khối. Tuy nhiên ở đây cũng quan sát thấy sự phân chia theo nhóm. Nhóm mang gen chịu nhiệt (gồm các nòi ĐN, GH-142, GH-191) có sự giảm trọng lượng sinh khối chậm hơn nhóm không mang gen chịu nhiệt (gồm các nòi GH-44, TP). Thí dụ nòi GH-191 có trọng lượng sinh khối ở 30°C là 41,7 g/l và ở 42°C là 7,3 g/l ; nòi GH-44 có trọng lượng sinh khối ở 30°C là 42,3 g/l và ở 42°C là 1,0 g/l.

Mặc dù đối với các nòi đem thử nghiệm có mang gen chịu nhiệt, nhưng 38°C có thể xem như là giới hạn trên đối với việc thu nhận sinh khối. Khi nhiệt độ lớn hơn 38°C có sự giảm đột ngột về khả năng tích lũy sinh khối và trọng lượng sinh khối thu được lúc này không còn ý nghĩa trong sản xuất thực tế (thấp hơn hoặc bằng 15 g/l).

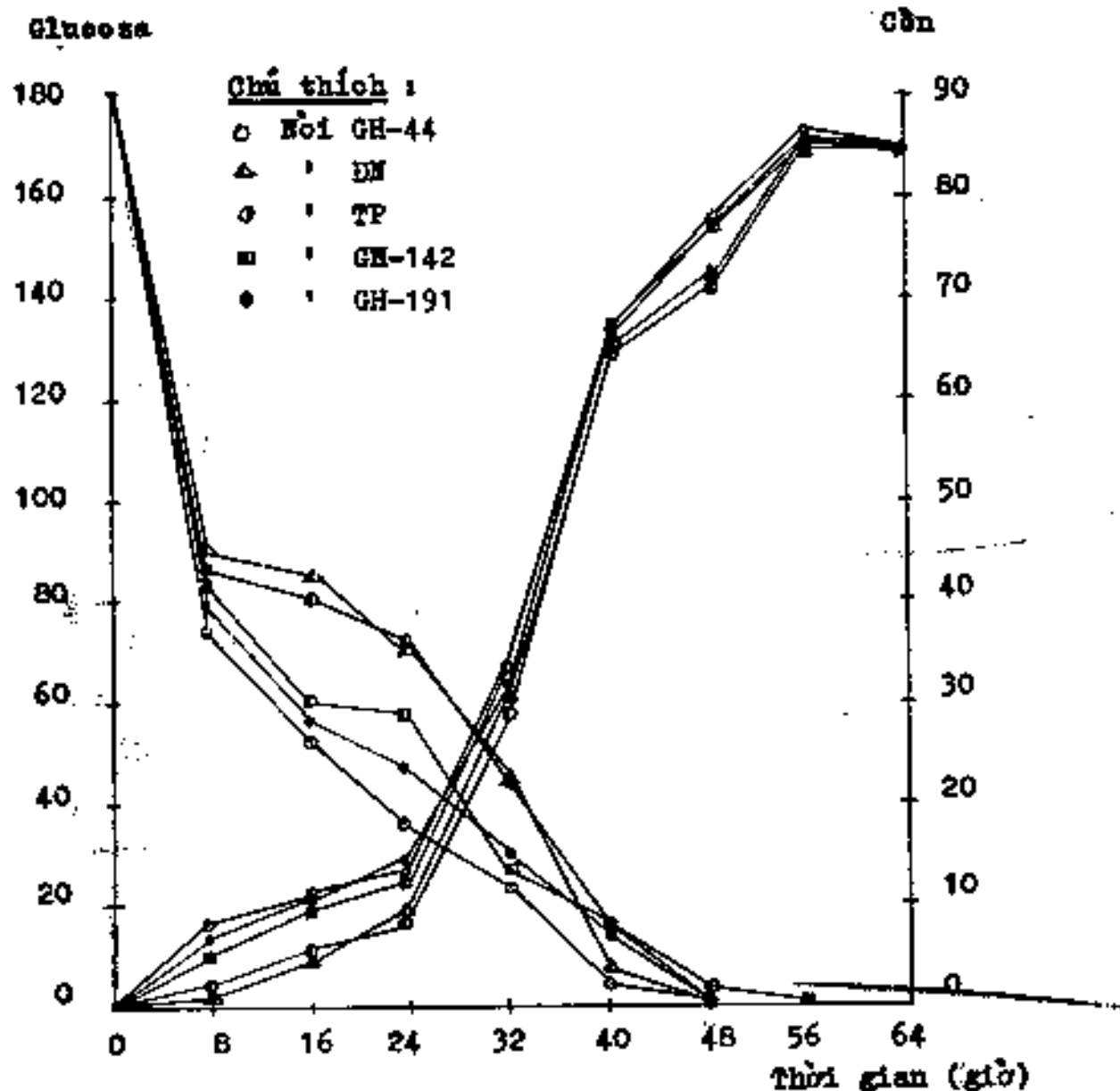
Trong số 5 nòi nấm men đem thử nghiệm không có một nòi nào có khả năng tích lũy sinh khối cao nhất ở cả 9 mức nhiệt độ. Mỗi nòi đều có một (hay một khoảng nhiệt độ) tối ưu cho sự sinh trưởng của mình. Cần lưu ý đặc điểm này khi sử dụng từng nòi nấm men cụ thể vào sản xuất. Tuy vậy có thể thấy ở bất kỳ nhiệt độ nào đã thử nghiệm thì cũng có nòi lai trong số các nòi có khả năng tích lũy sinh khối cao nhất. Thí dụ, ở 26°C là nòi GH-142 (42,1 g/l), ở 28°C nòi GH-44 (42,0 g/l), ở 30°C - GH-44 (42,3 g/l), ở 32°C - nòi GH-44 (41,7 g/l), ở 34°C - nòi GH-191 (33,6 g/l), ở 36°C - nòi GH-142 (30,6 g/l) và nòi GH-191 (30,7 g/l), ở 38°C - nòi GH-191 (29,6 g/l), ở 40°C - nòi GH-191 (14,1 g/l) và ở 42°C là nòi GH-191 (7,3 g/l). Khả năng sinh trưởng mạnh ở các nòi lai thường là do kết quả của ưu thế lai / 3/.



Hình 1: Trọng lượng sinh khối của các nôi nấm men khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau.

### Khả năng lên men tạo cồn trên môi trường glucoza :

Một trong những ứng dụng quan trọng của nấm men *S. cerevisiae* là dùng để sản xuất cồn từ rỉ đường. Trong quá trình này nhiệt độ là một thông số hết sức quan trọng. Người ta đã biết rằng nhiệt độ cao làm dừng sớm quá trình lên men, gây ra sự lên men không hoàn toàn. Kết quả là đường còn sót lại trong môi trường và sản phẩm tạo cồn giảm xuống /6,7,8,9/. Hơn nữa từ lâu người ta đã biết là hàm lượng cồn cực đại được tạo ra bởi một nôi nấm men nào đó phụ thuộc vào tính chống chịu cồn của nó. Nếu nôi nấm men có tính chống chịu cồn càng tốt thì hàm lượng cồn được tạo ra càng cao /9/. Vì thế mà việc tạo ra nôi nấm men mang tính chịu cồn, chịu cồn để dùng trong việc sản xuất cồn là rất cần thiết. Trước hết 3 nôi lại được kiểm tra về khả năng lên men tạo cồn



**Hình 2** : Sự thay đổi hàm lượng (mg/ml) của glucose và cồn trong quá trình lên men ở 30°C của các nòi nấm men.

ở 30°C cùng với 2 nòi DM, TP.

Trên hình 2 mô tả sự thay đổi về nồng độ đường glucose và cồn (mg/ml) trong môi trường lên men theo thời gian của các nòi nấm men khác nhau. Qua hình 2 có thể rút ra một số nhận xét sau :

+ Về sử dụng đường : Trong 8 giờ đầu, tất cả 5 nòi đều sử dụng đường mạnh mẽ gần giống như nhau. Chúng lên men khoảng 50% đường có trong môi trường. Đó có thể là do ở thời điểm này tế bào nấm men không những chỉ dùng đường để tạo cồn mà còn dùng đường để sinh trưởng (do có một lượng oxy nhất định hòa tan trong dung dịch) hơn nữa ở thời điểm này tế bào nấm men chưa bị tác dụng độc của cồn nội bào và cồn ngoại bào, nên chúng hoạt động chức năng sinh lý có hiệu quả.

Sau 8 giờ sự khác nhau giữa các nòi về khả năng sử dụng đường trở nên rõ rệt. Các nòi DM, TP, GH-44, GH-191 lên men hoàn toàn sau 48 giờ, nòi GH-142 sau 56 giờ. Tuy vậy có thể thấy rõ là ở các nòi tốc độ sử dụng đường chậm lại. Thật vậy, để lên men hết khoảng 50% đường còn lại chúng đã phải dùng tới 40 giờ, tức là gấp 5 lần thời gian so với tốc độ lên men ở 8 giờ đầu. Đó là do lúc này các tế bào đã tích lũy một hàm lượng cặn nội bào và chính cặn này đã có tác dụng có hại lên hoạt động sinh lý của tế bào.

+ Về sự tiết cặn : Trong 24 giờ đầu sự tiết cặn vào môi trường là chậm chạp. Có thể trong khoảng thời gian này cặn tạo ra được tích lũy lại bên trong tế bào. Tuy vậy có thể thấy sự khác nhau giữa các nòi về sự tiết cặn rõ nhất trong khoảng thời gian này. Sau 8 giờ nòi GH-44 cho 8,3 mg/ml cặn, nòi GH-142 cho 5,7 mg/ml, nòi GH-191 cho 7,9 mg/ml trong khi nòi DM chỉ cho 1,1 mg/ml và nòi TP cho 2,7 mg/ml. Sau 24 giờ có sự tăng đột ngột về tốc độ tiết cặn vào môi trường, rất có thể ở thời điểm này do tác dụng độc của cặn nội bào mà tế bào có sự suy giảm về chức năng sinh học nên cặn được tiết vào môi trường chỉ đơn thuần theo gradien nồng độ. Ở tất cả các nòi nồng độ cặn đạt cực đại ( $\approx 86$  mg/ml) sau 56 giờ lên men.

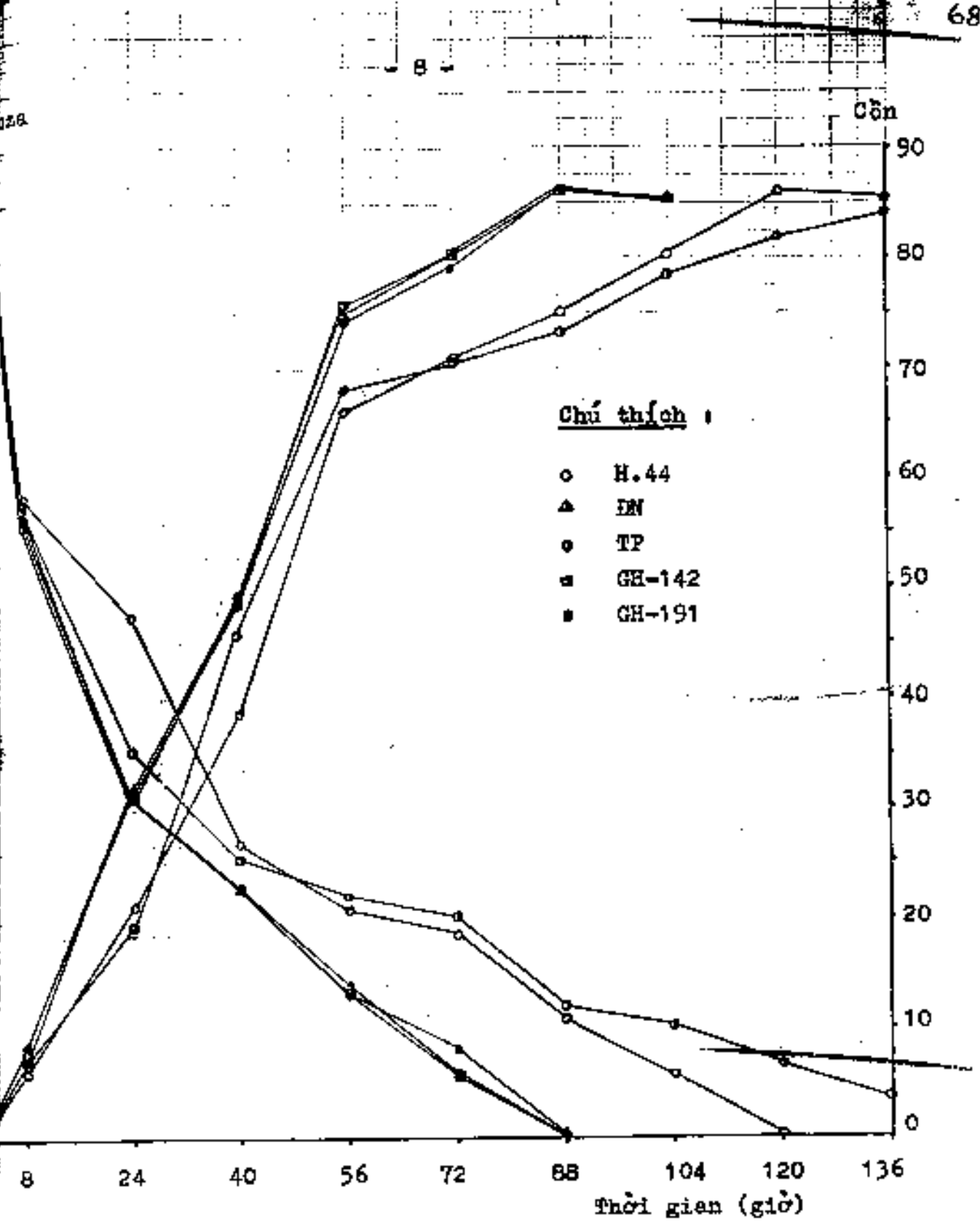
Trong công nghiệp lên men tạo cặn, nòi nấm men nào có khả năng tiết cặn sớm vào môi trường sẽ có ý nghĩa thực tiễn lớn do cặn có tác dụng chống nhiễm cho môi trường. Như vậy cả 3 nòi lại đều tỏ ra ưu việt hơn 2 nòi sản xuất về tính chất này.

Tiếp theo 3 nòi lại được kiểm tra về khả năng lên men tạo cặn ở 34, 38, 42°C cùng với 2 nòi DM, TP.

Trên hình 3, 4, 5 mô tả về sự thay đổi nồng độ đường glucoza và cặn (mg/ml) trong môi trường theo thời gian ở 34, 38, 42°C.

Các kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ cao có ảnh hưởng mạnh mẽ lên quá trình tạo cặn. Nó làm kéo dài thời gian lên men (thí dụ nòi lại GH-191 ở 30°C lên men hoàn toàn sau 48 giờ, nhưng ở 34°C sự lên men chỉ kết thúc sau 68 giờ và ở 38°C sự lên men dừng lại sau 104 giờ). Nó cũng làm dừng lại quá trình lên men, để sót lại đường trong môi trường (thí dụ nòi GH-191 ở 38°C để sót 10 mg/ml đường và ở 42°C để sót  $\approx 71$  mg/ml).

Ở cả 3 nhiệt độ đều quan sát thấy sự khác nhau về sử dụng đường



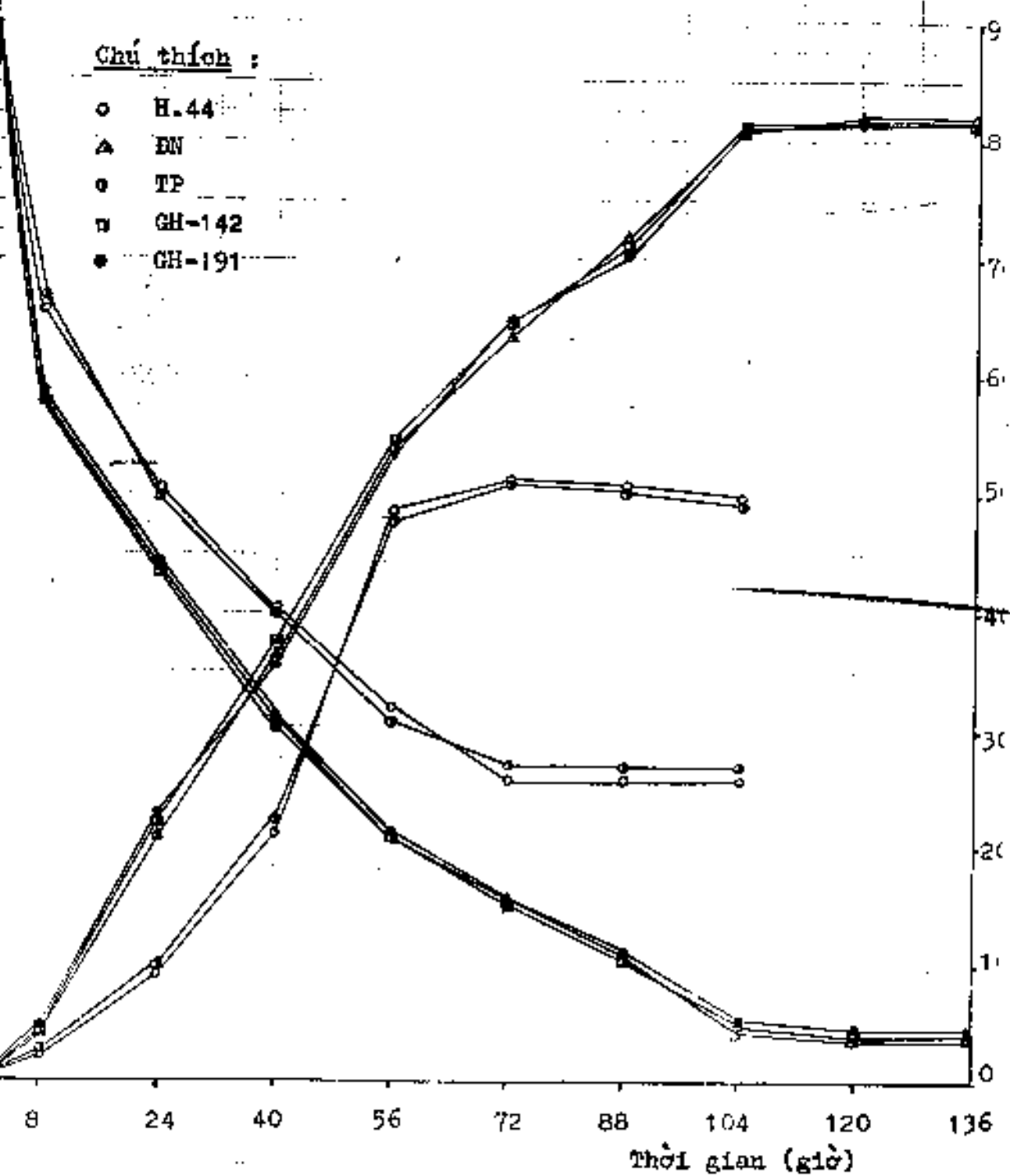
Hình 3. : Sự thay đổi hàm lượng (mg/ml) của glucose và cồn trong quá trình lên men ở 34°C của các nòi nấm men .

glucoza

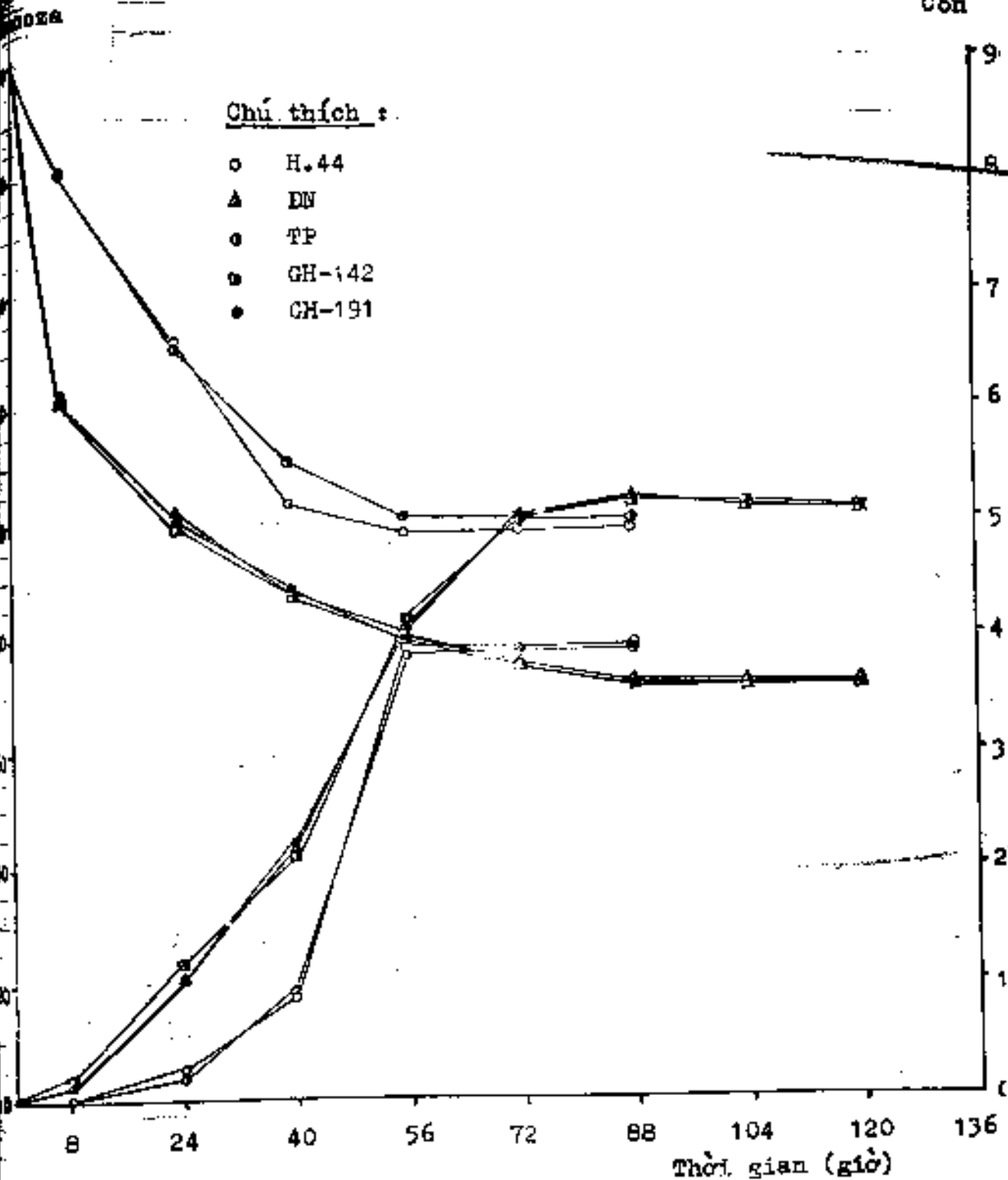
CBn

Chú thích :

- H.44
- ▲ EN
- ◐ TP
- ▣ GH-142
- GH-191



Hình 4 : Sự thay đổi hàm lượng (mg/ml) của glucoza và cồn trong quá trình lên men ở 38°C của các nòi nấm men .



**Hình 5 :** Sự thay đổi hàm lượng (mg/ml) của glucose và c5n trong quá trình lên men ở 42°C của các nòi nấm men .

**Bảng 2 :** Sinh khối (g/l) của các nòi nấm men sau khi lên men trên các môi trường và ở các nhiệt độ khác nhau.

Nhiệt độ (°C)	Môi trường	Nòi				
		DN	TP	GH-44	GH-142	GH-191
30	Glucose (tăng sinh khối)	10,7	7,9	12,8	16,2	15,6
34	(giảm sinh khối)	3,1	5,3	5,0	2,9	2,5
38	( - nt - )	5,3	9,9	9,6	5,4	4,9
42	( - nt - )	7,7	12,4	12,3	7,4	7,7
	Rỉ đường					
30	(tăng sinh khối)	9,2	6,7			14,7
34	(giảm sinh khối)	4,2	6,8			3,7

và tiết cặn giữa nhóm nòi mang gen chịu nhiệt (DN, GH-142, GH-191) và nhóm nòi không mang gen chịu nhiệt (GH-44, TP). Tuy nhiên sự khác biệt này rõ nhất và có ý nghĩa nhất ở 38°C. Ở nhiệt độ này các nòi DN, GH-142, GH-191 có thể lên men gần hoàn toàn (để sót 10 mg/ml đường) và tạo ra cặn có nồng độ tương đối cao ( $\approx$  82 mg/ml cặn), trong khi đó các nòi TP, ~~GH-44 để sót~~ 52 mg/ml đường và tạo ra cặn có nồng độ thấp hơn nhiều ( $\approx$  52 mg/ml cặn). Ở 34°C sự khác nhau giữa 2 nhóm nòi chỉ là về thời gian lên men. Các nòi DN, GH-142, GH-191 kết thúc sự lên men sau 88 giờ, nòi GH-44 kết thúc sự lên men sau 120 giờ và chúng đều tạo ra cặn với nồng độ 86 mg/ml. Nòi TP sau 136 giờ vẫn còn 10 mg/ml đường và mới chỉ tạo ra khoảng 84 mg/ml cặn. So với 38°C, ở 42°C sự khác biệt giữa 2 nhóm nòi giảm xuống. Ở điều kiện nhiệt độ này tất cả các nòi đều không có khả năng sử dụng hết đường. Quá trình lên men dừng lại sau khoảng 56-72 giờ. Các nòi GH-44, TP để sót 100 mg/ml đường, tạo ra cặn có nồng độ 38 mg/ml. Như vậy đối với các nòi nấm men đem thử nghiệm không thể tiến hành lên men tạo cặn ở 42°C.

Cuối cùng chúng tôi kiểm tra khả năng lên men tạo cặn của 3 nòi DN, TP và GH-191 trên môi trường rỉ đường ở 30 và 34°C. Kết quả cho thấy ở 30°C sau 56 giờ lên men cả 3 nòi đều cho cặn với hàm lượng như nhau (79 mg/ml), ở 34°C sau 88 giờ lên men 2 nòi DN và GH-191 cho 79 mg/ml cặn và nòi TP cho 56 mg/ml. Như vậy nòi GH-191 có năng lực lên men tạo cặn tương đương với nòi DN và vượt nòi TP.

### 3. Thu nhận sinh khối sau khi lên men tạo cồn :

Trong công nghiệp sản xuất cồn, sau khi lên men người ta thường thu lại sinh khối nấm men để dùng vào một số mục đích khác. Thí dụ như làm bánh mì, sản xuất các chế phẩm giàu protein và vitamin, axit nucleic, sản xuất thức ăn gia súc v.v... Kết quả (bảng 2) cho thấy sau khi lên men ở 30°C tất cả các nòi đều có sự tăng sinh khối trên cả môi trường glucoza và rỉ đường. Tuy nhiên sự tăng sinh khối của các nòi không phải như nhau. Thí dụ trên môi trường glucoza nòi TP có sự tăng sinh khối thấp nhất (7,9 g/l), nòi GH-142 có sự tăng sinh khối cao nhất (16,2 g/l).

Ở 34, 38 và 42°C tất cả các nòi đều có sự giảm trọng lượng sinh khối và sự giảm trọng lượng sinh khối ở các nòi khác nhau là khác nhau. Thí dụ trên môi trường rỉ đường ở 34°C nòi TP giảm 6,8 g/l và nòi GH-191 giảm 3,7 g/l.

Trường hợp tăng trọng lượng sinh khối là do tốc độ sinh trưởng lớn hơn tốc độ chết của tế bào, còn sự giảm trọng lượng sinh khối là do tốc độ sinh trưởng thấp hơn tốc độ chết khi lên men ở những điều kiện không thuận lợi. Các chỉ số này phụ thuộc vào tính chống chịu nhiệt, chống chịu cồn của nòi. Các nòi có tính chống chịu nhiệt, chống chịu cồn tốt sẽ hạn chế được các tác dụng có hại của nhiệt độ và của cồn lên sự sinh trưởng của mình.

Dựa vào toàn bộ các kết quả thí nghiệm trên đây có thể thấy nòi lai GH-191 có năng lực sản xuất cồn tương đương với nòi DM, nhưng có sự tăng trọng lượng sinh khối ở 30°C vượt nòi DM và có sự giảm trọng lượng sinh khối (ở 34, 38 và 42°C) thấp hơn nòi DM. Sau 8 giờ lên men ở 30°C nòi lai GH-191 tạo ra 7,9 mg/ml cồn, trong khi nòi DM chỉ tạo ra 1,1 mg/ml cồn. Hơn nữa nòi DM lại không sinh bào tử /3/, còn nòi GH-191 có khả năng sinh bào tử tốt (62%), điều đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu di truyền học và cải tạo giống. Do có những đặc điểm ưu việt vừa nêu, có thể giới thiệu nòi lai GH-191 cho công nghiệp sản xuất cồn.

### III. KẾT LUẬN :

Trên cơ sở những kết quả thí nghiệm có thể rút ra một số kết luận cho những nòi nấm men được đem thử nghiệm :

1. 38°C là giới hạn trên cho việc sản xuất sinh khối nấm men. Khi nhiệt độ lớn hơn 38°C sự tích lũy sinh khối không còn có ý nghĩa trong sản xuất thực tế (< 15 g/l)

2. 38°C là giới hạn trên cho việc lên men tạo cồn. Khi nhiệt độ lớn hơn 38°C các nòi không còn khả năng sử dụng hết đường có trong môi trường.
3. Ở 30°C có thể dùng các nòi GH-44, GR-191 để lên men tạo cồn. Chúng có khả năng tạo cồn có nồng độ cao ngay trong khoảng thời gian đầu của sự lên men, điều đó có tác dụng chống nhiễm cho môi trường.
4. Ở 34 và 38°C có thể dùng nòi GH-191 để lên men tạo cồn. Nó có năng lực lên men vượt nòi T1 và tương đương với nòi EW, nhưng có sự giảm trọng lượng sinh khối thấp hơn nòi này. Điều đó có ý nghĩa thực tiễn cho việc thu nhận sinh khối nấm men sau khi lên men để dùng vào những mục đích kinh tế khác.

#### IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO :

1. Nguyễn Văn Hưng. Nghiên cứu đặc điểm di truyền học của một số các tính trạng chống chịu và lai tạo các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có ý nghĩa kinh tế. Luận án PTS, trường ĐHTH Hà nội, 1990.
2. Lê Đình Lương. Di truyền học vi sinh vật. Trường ĐHTH Hà nội, 1970.
3. Tạ Thu Thủy. Lai tạo giống nấm men có ý nghĩa kinh tế. Luận văn tốt nghiệp, trường ĐHTH Hà nội, 1989.
4. Сахаров И.А., Кошкин С.А., Кошкин Т., Федорова И.В. Сборник методик по селекции дрожжей. Сахаромикеталь. Изд. "Наука". Ленинград, 1976.
5. Кошкин К.В. Генетика методов селекции дрожжей. Изд. "Наука", Москва, 1979.
6. Jones.R.P., Parment.N., and Greenfiend.P.F. Process Biochem., 16, 42, 1981.
7. Kouwel.P.G., and Braber.L., Biotechnol.Lett., 1,403,1979.
8. Lee.J.H., Williamson.D., and Rogers.P.L., Biotechnol. Lett., 2, 141, 1980.
9. Nagodawithana.T.W., Castellano.C., and Steincraus.K.H., Appl. Microbiol., 28,283,174.
10. Stewart.G.G., Can.J.Microbiol., 27,973,1981.

11. UNIDO. Genetic Engineering and Biotechnology Monitor.  
26, 41, 1988.

SUMMARY

STUDY OF DEVELOPMENT OF HYBRID YEAST STRAINS  
INTO ALCOHOL PRODUCTION

Nguyễn Văn Hùng, Dương Văn Hốp,  
Lê Đình Lương  
University of Hanoi.

3 hybrid yeast strains GH-44, GH-141 and GH-191 were studied on biomass's accumulation and ability of alcohol production in comparison with 2 strains being used in industry at different temperatures (from 26 to 42°C). It was showed that hybrid yeast strain GH-191 may be used in alcohol producing industry.

---

# SỰ SỬA CHỮA ADN PLASMID ĐÃ BỊ CHIẾU XẠ Ồ BÊN TRONG TẾ BÀO NẤM MEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

LE THANH LAM — Trường Đại học

Tổng hợp — Hà Nội

K. FLANQUE — Trường Đại học Tổng hợp

Leiden — Hà Lan

## TÓM TẮT

Sau khi bị chiếu xạ ở các liều lượng khác nhau của tia tử ngoại, các ADN plasmid pJDB 207 và pYE (CEN3) 41 đã được dùng để biến nạp các nòi nấm men *Sacch. cerevisiae*. Những số liệu thu được chứng tỏ rằng các sai hỏng do chiếu xạ gây ra ở ADN plasmid đã được sửa chữa ở bên trong tế bào của nòi nấm men kiểu dại RAD và của thể đột biến rad 3-1.

## MỞ ĐẦU

Thông thường, các sai hỏng do chiếu xạ gây ra ở ADN có thể được sửa chữa nhờ phản ứng quang hóa các dimer pyrimidine và sửa chữa theo kiểu cắt xen các thương tổn lớn. Các men có phản ứng quang hóa đã được phát hiện ở các loại tế bào khác nhau kể từ *Mycoplasma*, một loại vi khuẩn đơn giản nhất, đến tế bào động vật (8). Ở bước đầu tiên của phản ứng, men nhận biết và biến một cách đặc hiệu vào các dimer ở trong băng tế. Sau đó, nhờ lớp thụ năng lượng của ánh sáng mà men sửa chữa các cyclobutyl dimer thành pyrimidinemonomer. Cuối cùng, men được giải phóng khỏi ADN sự sửa chữa theo kiểu cắt xen chiếm ưu thế ở hầu hết các vi sinh vật. Việc loại bỏ các base nitơ không bình thường được thực

hiện trước hết bằng cách cắt đứt cầu nối giữa đường và base nitơ sau đó là khôi phục vết thương, tổng hợp chuỗi mới và cuối cùng là hàn vá lại.

Nấm men *Sacch. cerevisiae* là loại vi sinh vật rất thuận tiện cho việc nghiên cứu cơ chế phân tử của việc sửa chữa theo kiểu cắt xen ở vi sinh vật Eukaryote. Nó có 10 locus khác nhau cần thiết cho việc sửa chữa theo kiểu cắt xen: RAD1, RAD2, RAD3, RAD4, RAD7, RAD10, RAD14, RAD16, MMS10 và UVS12. Ngoài ra, có 2 locus CDC 8 và CDC 9 cũng có thể liên quan đến khả năng sửa chữa theo kiểu cắt xen (9, 10, 11, 12, 13, 16, 17). Thể đột biến rad 3-2, mặc dù không có khả năng sửa chữa các dimer pyrimidine ở ADN nhân của chính mình, lại hoàn toàn có khả năng sửa chữa những sai hỏng như vậy ở ADN plasmid (2). Từ những hiểu biết trên, chúng tôi đã quyết định tìm hiểu khả năng sửa chữa của thể đột biến rad 3-1 đối với các ADN plasmid pJDB 207 và pYE (CEN3) 41 đã bị chiếu xạ.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các nòi vi khuẩn và nấm men dùng cho nghiên cứu này do phòng thí nghiệm Di truyền học phân tử trường Đại học Tổng hợp Leiden Hà Lan cung cấp và được trình bày ở bảng 1.

BẢNG 1. Các nòi vi khuẩn và nấm men dùng trong nghiên cứu này.

	Nòi	Genotyp	Nguồn gốc
Vi khuẩn	MH <sub>1</sub>	ara D 139, (ara-leu) lac X 74 galU, galK, ham str A	Devoret 1967
	KA 158	rec A <sub>13</sub> , thr, leu, pro, his, thi, arg, lac, ara, xyl, str	Devoret 1967
	KA 172	F rec A <sub>13</sub> uvr A <sub>6</sub> pro, gal, lac.	Devoret
Nấm men	57	MAT <sub>2</sub> , leu <sub>2</sub> , ade, his, rad <sub>1</sub> .	A Ya541
	165	MAT <sub>2</sub> rad <sub>3-1</sub> leu <sub>2</sub> , his.	"
	58	leu <sub>2</sub> , his, RAD.	"

## MÔI TRƯỜNG :

— Môi trường đủ cho nấm men gồm có: 3% Yeast extract, 1% difco bacto peptone và 2% glucose.

— Môi trường tối thiểu cho nấm men gồm có 0,67% Yeast nitrogen base và 2% glucose.

— Môi trường chọn lọc cho nấm men: là môi trường tối thiểu được bổ sung các axit amin và vitamin cần thiết. Ở thí nghiệm này, histidine và adenine đã được bổ sung vào môi trường tối thiểu.

Môi trường đủ cho vi khuẩn gram âm: 1% difco tryptone, 0,5% difco bacto yeast extract, 0,5% NaCl, 0,1% glucose.

## PLASMID :

Plasmide pJDS 207 được tạo ra bởi Beggs, JD 1978 (1)

Plasmid pYE (CEN3) 41 được tạo ra bởi Clark, L và Carbon, J. 1980 /3/.

pJDS 207 có chứa: ADN của plasmid pBR 322 cùng với dãy tự sao chép của nó và kháng đối với tetracycline, ampiciline. một đoạn ADN plasmid nấm men 2 $\mu$  cùng với dãy tự sao chép của nó và có mang gen LEU2. Ở plasmid pYE (CEN3) 41 thì ngoài ADN của pBR 322 còn có dãy CEN 3 cùng với dãy tự sao chép của nấm men và gen LEU2. Hệ thống dấu chuẩn này cho phép ADN-plasmid được nhân lên cả trong các tế bào nấm men và E.coli đồng thời dễ dàng chọn lọc được các thể biến nạp.

ADN plasmid được tách ra từ E.coli sau đó được tinh sạch bằng li tâm siêu tốc ở gradient nồng độ của CsCl - EtBr theo Maniatis et al. (1982/7):

## BIẾN NẠP :

— Biến nạp nấm men bằng ADN plasmid chưa chiếu xạ và đã chiếu xạ theo phương pháp của Beggs 1978(1).

— Biến nạp E. coli theo phương pháp của Maniatis et al 1982 (7).

— Chiếu xạ ADN plasmid: Dung dịch ADN plasmid được đặt thành từng giọt có hàm lượng ADN xác định trên màng SARAN và chiếu xạ với các liều lượng định trước.

— Xử lý ánh sáng xanh (có bước sóng 480nm).

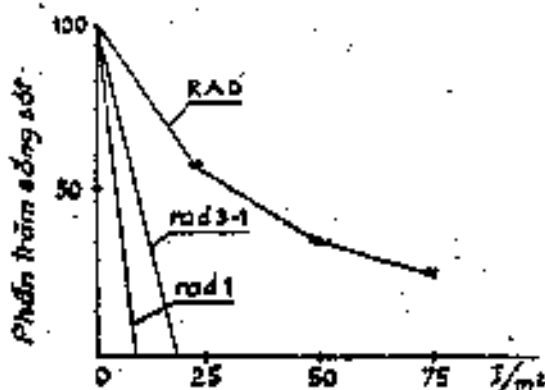
Sau khi biến nạp, các đĩa được ủ ở 28°C. 48h. Sau đó chia đôi số đĩa, một nửa được xử lý ánh sáng xanh 2' (các đĩa được đặt

cách nguồn sáng 10 cm) và lai ủ tiếp ở 28°C.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tính miễn cảm đối với tia tử ngoại của các nòi nấm men.

Từ hình 1 ta có thể thấy rằng các nòi nấm men dùng trong nghiên cứu này có sự khác nhau đáng kể về tính miễn cảm đối với tia tử ngoại. Với liều lượng 25J/m<sup>2</sup>, độ sống sót của các thể đột biến rad1 và rad<sub>2-1</sub> đã giảm đến 0. Cũng với liều lượng đó, độ sống sót của nòi kiểu dại RAD chỉ giảm 48%, còn ở liều lượng 50J/m<sup>2</sup> giảm 59%, ở liều 75J/m<sup>2</sup> giảm 70%. Nghĩa là dưới tác động của tia tử ngoại, nòi kiểu dại tỏ ra bền vững hơn so với các thể đột biến.



Hình 1: Các đường cong biểu diễn sự liên quan giữa độ sống sót và liều lượng UV của các nòi nấm men: rad 1, rad<sub>2-1</sub>, RAD.

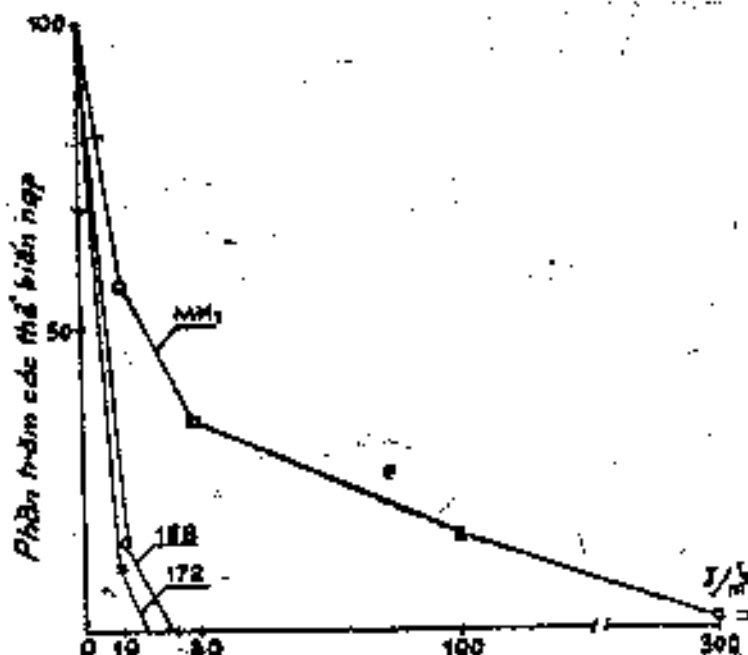
2. Sự sửa chữa ADN plasmid đã bị chiếu xạ trong tế bào E.coli.

Thông thường, tế bào E.coli có khả năng sửa chữa một số hư hỏng ở ADN nhờ quá trình phục hồi ngoài ánh sáng và phục hồi trong bóng tối. Ngoài ra còn có quá trình phục hồi nhờ tái tổ hợp. Người ta đã xác định được các gen: uvr A, uvr B, uvr C, rec A, rec B, rec C tham gia vào các quá trình đó. Tế bào E.coli có mang đột biến ở những gen đó thì rất miễn cảm với tác động của tia tử ngoại (3,18). Các nòi E.coli KA 158, KA 172 là những nòi như thế; còn nòi kiểu dại MH, theo lẽ thường, bền vững hơn.

Việc xem xét khả năng sửa chữa của chúng đối với các hư hỏng ở ADN plasmid được tiến hành lần lượt như sau: Tách chiết ADN plasmid, chiếu xạ tia UV ở các liều lượng xác định, sau đó dùng chúng để biến nạp các nòi E.coli. Các thể biến nạp được chọn

lọc trên môi trường có tetracycline và ampiciline, vì plasmid có mang các gen kháng với các chất kháng sinh này. Hiệu quả của quá trình sửa chữa được đánh giá qua việc tính điểm số thể biến nạp đã sinh ra.

Như có thể thấy trên hình 2, khi chiếu xạ ADN plasmid thì ngay ở liều lượng thấp của tia tử ngoại  $10J/m^2$  cũng chỉ có 10% thể biến nạp được sinh ra ở nòi KA 172 và 15% ở nòi KA 158.



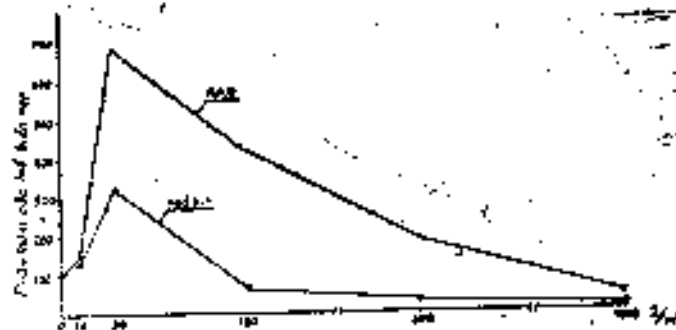
Hình 2. Khả năng hình thành các thể biến nạp với ADN plasmid đã bị chiếu tia tử ngoại ở các liều lượng khác nhau của các nòi E.coli: MH1, KA 158, KA 172.

Còn ở liều lượng  $30J/m^2$  thì khả năng biến nạp đã bị giảm đến 0. Cũng với các liều lượng đó nòi kiểu dại MH1 lần lượt có 60% và 40% thể biến nạp được sinh ra. Khi liều lượng của tia tử ngoại lên đến  $500J/m^2$  thì vẫn có 4% thể biến nạp được sinh ra ở nòi MH1. Nghĩa là các nòi E.coli khác xa nhau về khả năng tạo ra thể biến nạp với ADN plasmid đã bị chiếu xạ.

3. Sự sửa chữa của ADN plasmid đã bị chiếu xạ trong tế bào nấm men *Sacch. cerevisiae*.

Trong loạt thí nghiệm tiếp theo, sự sửa chữa của ADN plasmid đã bị chiếu xạ ở

bên trong tế bào của các nòi nấm men *Sacch. cerevisiae* khác nhau đã được so sánh. Việc làm cũng giống như đối với các nòi E.coli. Ở đây, các thể biến nạp sẽ xuất hiện trên môi trường chọn lọc, vì plasmid có mang gen LEU 2 của nấm men. Hiệu quả của quá trình sửa chữa cũng được đánh giá qua việc tính điểm số thể biến nạp được sinh ra. Như có thể thấy trên hình 3, khác với các nòi E. coli, giữa nòi nấm men đột biến rơđ 3-1 và nòi nấm men kiểu dại RAD không có sự khác nhau đáng kể về khả năng tạo ra các thể biến nạp.



Hình 3. Khả năng hình thành các thể biến nạp với ADN plasmid đã bị chiếu tia tử ngoại ở các liều lượng khác nhau của các nòi nấm men *Sacch. cerevisiae*: RAD, rđ 3-1.

Khi ủ kéo dài và tính đến số thế biến nạp được sinh ra thêm thì thấy rằng tỷ lệ của các thế biến nạp giữa các liều lượng UV khác nhau đã thay đổi theo hướng tăng dần từ liều lượng thấp đến liều lượng cao (bảng 2).

**Liều lượng UV**

Số thế biến nạp được sinh ra

Nơi	0	10	30	100	300	1000J/m <sup>2</sup>
<b>RAD</b>						
Đếm lần 1	16	24	111	68	34	8
%	100	150	693	431	212	50
Đếm lần 2	206	222	318	465	505	131
%	100	107	154	225	250	64
Đếm lần 3	320	327	384	615	685	228
%	100	105	120	192	214	71
Đếm lần 4	414	428	436	650	736	335
%	100	103	105	157	178	81

**rad<sub>1</sub>**

Đếm lần 1	36	51	137	23	8	5
%	100	141	320	63	22	14
Đếm lần 2	98	119	308	84	85	30
%	100	121	314	85	87	31
Đếm lần 3	128	166	368	132	147	63
%	100	130	287	103	114	50
Đếm lần 4	174	197	418	188	276	177
%	100	113	240	108	158	102

Bảng 2: Số thế biến nạp được sinh ra và tỷ lệ phần trăm của chúng giữa các liều lượng UV sau 4 lần tính đến.

Một bức tranh tương tự cũng đã thấy khi tiến hành thí nghiệm với plasmid pYE (CEN3) 41 (bảng 3).

**Liều lượng UV**

Số thế biến nạp được sinh ra

Nơi	0	10	30	100	300	1000J/m <sup>2</sup>
<b>rad<sub>1</sub></b>						
Đếm lần 1	765	698	1440	1690	447	68
%	100	89	183	216	57	9
Đếm lần 2	990	830	1657	1947	685	193
%	100	84	167	196	69	19

Bảng 3: Số thế biến nạp được sinh ra và tỷ lệ % của chúng.

Trong các nghiên cứu trước đây Friedberg, Wilcox và Prakash (14, 15, 16) đã khẳng định rằng tất cả các gen trong nhóm gen ức chế tương hỗ RAD3 và gen RAD10 là cần thiết cho việc phục hồi các dimer pyrimidine theo kiểu cắt xén.

Những nòi mang các đột biến rad1, rad2, rad3, rad4 và rad10 là không có khả năng cắt sợi ADN bị hư hỏng do chiếu xạ UV in vivo.

Kết quả của chúng tôi trình bày ở trên chứng tỏ rằng thế đột biến rad 3-1 là hoàn toàn có khả năng sửa chữa các hư hỏng do UV gây ra ở ADN plasmid. Hiệu quả của quá trình sửa chữa là đáng kể nhất là ở các liều lượng cao của UV và đã đạt 102% sau 4 lần tính đến. Đồng thời tỷ lệ phần trăm của các thế biến nạp được sinh ra tại các liều lượng 10J/m<sup>2</sup>, 30J/m<sup>2</sup> là cao hơn so với liều 0J/m<sup>2</sup>. Điều đó có nghĩa là việc sinh ra các thế biến nạp tại các liều lượng đó đã được kích thích. Kết quả tương tự đã thu được ở 4 lần thí nghiệm riêng rẽ.

**Liều lượng UV**

Số thế biến nạp được sinh ra

Nơi	0	10	30	100	300	1000J/m <sup>2</sup>
<b>rad<sub>1</sub> Xử lý ánh sáng xanh</b>						
Đếm lần 1	84	40	30	47	16	10
%	100	47	35	56	19	12
Đếm lần 2	114	82	50	99	32	27
%	100	57	35	69	22	19
Đếm lần 3	210	108	77	146	75	59
%	100	51	37	69	36	28

**rad<sub>1</sub> Không xử lý ánh sáng xanh**

Đếm lần 1	92	55	22	38	14	9
%	100	60	24	31	15	10
Đếm lần 2	127	74	45	76	53	28
%	100	58	35	60	42	22
Đếm lần 3	171	99	71	117	83	51
%	100	58	42	68	48	30

Bảng 4: Số thế biến nạp được sinh ra ở lô thí nghiệm xử lý ánh sáng xanh và ở lô không xử lý như thế.

Ngoài ra, vai trò của phản ứng quang hóa đối với quá trình phục hồi của ADN plasmid pJDE 207 đã bị thiếu xạ bên trong tế bào nấm men cũng được kiểm tra. Số liệu ở bảng 4 chứng tỏ rằng không có sự sai khác đáng kể về khả năng sinh ra các thế biến nạp giữa lô được xử lý ánh sáng xanh và lô không được xử lý như thế. Điều đó có nghĩa là sự phục hồi theo kiểu cắt xén là chiếm ưu thế.

**KẾT LUẬN**

Từ những kết quả được trình bày ở trên có thể rút ra những kết luận như sau:

— Thể đột biến *rad 3-1* của nấm men, dù không có khả năng phục hồi các hư hỏng của ADN nhân của chính mình lại hoàn toàn có khả năng phục hồi các hư hỏng như thể ở ADN plasmid.

— Hiệu quả của quá trình phục hồi các hư hỏng do UV gây ra ở ADN plasmid trong tế bào nấm men là khá cao.

— Quá trình phục hồi theo kiểu cắt xén là chiếm ưu thế.

Nghiên cứu này được tiến hành dưới sự tài trợ của chương trình VERA. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn giáo sư Pieter van Putte đã cho phép sử dụng thiết bị, hóa chất, phòng của phòng thí nghiệm di truyền học phân tử, trường ĐHTH Leiden Hà Lan. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của P.Magne, S.Caramer, M.Mickey trong quá trình tiến hành thí nghiệm. Cuối cùng, chúng tôi xin cảm ơn giáo sư Lê Đình Lương đã dành thời gian đọc và góp ý cho bài này.

### SUMMARY

Irradiated plasmid DNA of pJDB 207 and *pye* (CEN3)  $\Delta$  were used to transform *rad 3-1* and RAD strains of yeast. The obtained data show that the lesions in the plasmids can be repaired in the RAD strain and partially in the *rad3-1* mutant.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boggs, J.D. (1978) *Nature* 275: 104-9
2. Bekker, M.L. O.K., Koboeb and Konvalsova. 1969. *Mol. Gen. Genet.* 177: 581-544.
3. Clarke, L. and Carbon, J. (1980) *Nature*. 287: 504-9.
4. Dominicki, Z. and Jaskymyzc, W.J. 1984. *Mol. Gen. Genet.* 193: 167-171.
5. Kornberg, A. *DNA Synthesis*. 1974. 249-315.
6. Kornberg, A. *DNA Replication*. 1979. 607-624.
7. Maniatis, T.E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory manual*.
8. Prakash, L. 1975. *J. Mol. Biol.* 98: 781-793.
9. Prakash, L. 1977. *Mutat. Res* 45: 13-22.
10. Prakash, L. 1977. *Mol. Gen. Genet.* 152: 125-128.
11. Prakash, L. and S. Prakash. 1979. *Mol. Gen. Genet.* 178: 351-359.
12. Resnick, M. and J.K. Setlow. 1972. *J. Bacteriol.* 108: 879-886.
13. Reynolds, P.J. 1978. *Mutat. Res* 50: 43-58.
14. Richard, J. Reynolds and Friedberg. 1969. *J. Bacteriol.* 147: 692-704.
15. Richard, J. Reynolds and Friedberg. 1981. *J. Bacteriol.* 147: 705-706.
16. Unrau, P.R. Wheatcroft and Cox. 1971. *Mol. Gen. Genet.* 113: 359-362.
17. Waters, P. and Moustachi 1974. *Biochim. Biophys. Acta.* 253: 407-419.
18. Wilcox, D.H. and Prakash. 1971. *J. Bacteriol.* 148: 618-623.
19. P.F. Smith-Keary. 1975. *Genetic structure and Function* 262-236.

# TÁC DỤNG SỬA CHỮA ADN BỊ TÀN THƯƠNG DO TIA TỬ NGOẠI CỦA DẦU GẮC VIỆT NAM

LE DINH LUONG

Bộ môn Di truyền — Trường Đại học  
Tổng hợp Hà Nội

HÀ VĂN MẠO, MAI HỒNG BANG  
Viện Quân y 108

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Khi gung Beta-Caroten và các chất retinoid R.Pepa, B.Doll và một số tác giả khác đã làm giảm một cách đáng kể tỉa suất xuất hiện ung thư trên thực nghiệm.

Ở Việt Nam đã cần xuất được một loại chế phẩm dầu gấc rất giàu Beta-Caroten. Chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu tác dụng của nó đối với bệnh ung thư. Vì hầu hết các tác giả đều khẳng định: Các tác nhân gây ung thư đều thông qua cơ chế gây tổn thương ADN, cho nên bước đầu chúng tôi dùng mô hình nấm men để chứng minh khả năng của dầu

gấc trong việc sửa chữa ADN bị tàn thương do tác động của tia tử ngoại.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* dùng trong thí nghiệm là các nòi do bộ môn Di truyền học — Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội cung cấp (bảng 1).

Đây là các thể đột biến có các gen mẫn cảm với tia tử ngoại ký hiệu là rad và ADN của chúng dễ bị tổn thương do tác nhân gây đột biến này.

BẢNG 1. CÁC NÒI NẤM MEN DÙNG TRONG THÍ NGHIỆM

KÝ HIỆU NÒI	GENOTYP
X4119-19C MG 79	$a^{III}his7^{III}tyr1^{III}cdc9^{IV}aro18^{III}hom2^{IV}$ $rad2^{VII}trp1^{VIII}gal2^{XII}ade2^{XV}lys11^{IX}$
STX 145-15D MG 81	$IIIcdc19^{I}tyr1^{III}lys2^{II}gal1^{II}trp1^{IV}rad4^{V}$ $act14^{XI}ura1^{XI}gal2^{XII}lys9^{XIV}pet8^{XIV}ade2^{XV}gal5^{XV}$
STX 66-4A MG 82	$a^{III}rad18^{III}lys4^{IV}trp1^{IV}prt3^{V}cupr^{V}gal2^{XV}$ $ad2^{XV}met2^{XVI}pha2^{XVII}$
STX 155-9C MG 93	$a^{III}ad1^{III}gal1^{III}lys5^{VII}aro2^{VIII}his6^{IX}ura2^{X}$ $gal2^{XII}lys7^{XIII}prt1^{XVI}rad1^{XVI}met14^{XVII}$
X3119-12C MG 95	$IIIgal1^{III}leu2^{III}his2^{IV}lys1^{IX}his6^{IX}lv3^{X}ura1^{XI}met14^{XI}$ $clv7^{XI}gal2^{XII}pet8^{XIV}ade2^{XV}rad2^{VII}$

## 2. Môi trường nuôi cấy

$KH_2PO_4$	2 gam
$MgSO_4$	1 gam
$NH_4NO_3$	20 gam
Glucose	20 gam
Cao nấm men	3-6 gam
Thạch	20 gam

Pepton	10 gam
Nước	1.000 ml

## 3. Nguồn tế ngoại:

Dùng đèn tế ngoại:	
Bước sóng	260 nm
Khoảng cách chiếu	21 cm
Lưu lượng chiếu: tính bằng giây	

#### 4. Thuốc thử:

Dùng một chế phẩm đông được sản xuất từ quả gấc của Việt Nam có tên là Dầu gấc (DG). DG là một chế phẩm do Giáo sư Đinh Ngọc Lâm và giáo sư Hà Văn Mạc nghiên cứu sản xuất từ cây gấc (*Momordica cochinchinensis*) (leur) Spreng, họ Bầu Bí (*Cucurbitaceae*).

Theo phân tích nghiên cứu của giáo sư Nguyễn Đán, DG có Beta-caroten, lycopen là những tiền vitamin A và có nhiều axit hữu cơ như: s.linoic: 14%, s.oleic: 44,4%, s.tenuic: 7,96%, s.pentmitic: 33,8%. Định lượng Beta-caroten theo Viện kiểm nghiệm trung ương (Bộ y tế) DG đạt 0,192% Beta-caroten tức là trong 100 ml DG có 0,192 mg Beta-caroten.

Từ DG nguyên chất chúng tôi đem pha loãng thành các nồng độ khác nhau bằng 2 loại dung môi hòa tan dầu: Tween 80 và Mineral oil, gồm các nồng độ 1/2, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 để tìm nồng độ DG bắt đầu có tác dụng và nồng độ có tác dụng mạnh nhất. Vitamin A cũng đem pha với nồng độ như DG để so sánh tác dụng với DG.

#### a. Phương pháp:

a) Phân lập lại các tế bào nấm men mẫn cảm với UV:

Từ giống *S. cerevisiae* ban đầu đem pha loãng ở nồng độ thích hợp rồi cấy lên một trường nuôi cấy và giữ ở 30°C. Sau 48 h nấm men mọc thành các khuẩn lạc riêng rẽ có kích thước thích hợp. Ghi ký hiệu trên mặt hộp petri các lô thí nghiệm khác nhau: có 1 lô đối chứng không chiếu UV, các lô thí nghiệm được chiếu UV ở liều lượng 5 giây, 10 giây. Sau khi chiếu UV xong giữ tất cả các lô thí nghiệm và lô đối chứng ở 30°C trong tủ ẩm trong 48 h.

Sau 48 h mang các hộp Petri ra, đưa vào vị trí từng khuẩn lạc trên lô đối chứng và lô chiếu xạ để chọn ra các tế bào nhạy cảm nhất với UV, tức là các khuẩn lạc bị chết ở hộp petri có liều lượng chiếu UV thấp nhất, chọn các tế bào đó ở cùng vị trí trong hộp petri đối chứng, cấy thành giống tươi để làm các thí nghiệm tiếp sau.

b) Tiến hành thử tác dụng của DG lên các tế bào nấm men mẫn cảm với UV đã phân lập được:

-- Pha một ít giống tươi vào một ống nghiệm chứa 4,5 ml nước cất vô trùng làm sao cho nồng độ của dịch huyền phù vừa mức thích hợp, hút lấy 0,2 ml cấy lên một hộp petri dùng làm đối chứng 1 (không chiếu UV).

-- Dịch huyền phù còn lại đem đổ ra một hộp petri vô trùng rồi đem chiếu UV với liều lượng đã phân lập được tùy từng loại nấm men khác nhau. Thời gian chiếu UV tính từ lúc mở tới lúc đóng nắp hộp petri.

-- Sau khi chiếu UV, dịch chiếu cho vào một ống nghiệm vô trùng lắc đều rồi chia thành các lô thí nghiệm khác nhau. Hút lấy 0,2 ml cấy lên một hộp petri dùng làm đối chứng 2 (chiếu UV nhưng không xạ lý gì). Các hộp petri tiếp theo được cấy nấm men sau khi chiếu UV có xạ lý DG và vitamin A. Đối với DG và vitamin A pha loãng bằng Tween 80 thì xạ lý DG và vitamin A luôn bằng nồng độ khác nhau từ 1/100 đến 1/2 vì Tween 80 làm tan dầu trong nước. Còn đối với DG và vitamin A pha bằng mineral oil thì phải ly tâm lấy cặn tế bào rồi mới xạ lý DG hoặc vitamin A vì mineral oil không làm tan dầu trong nước. Như vậy các lô thí nghiệm gồm các hộp petri được cấy 0,2 ml dung dịch đã xạ lý DG hoặc vitamin A pha bằng Tween 80 hoặc mineral oil. Bên cạnh đó còn có các lô đối chứng chỉ xạ lý bằng Tween 80 hoặc mineral oil để xem 2 dung môi này có ảnh hưởng gì tới nấm men không. Sau thí nghiệm các hộp petri đều được để vào tủ ẩm 30°C trong 48 h. (Nhiệt độ 28—30°C là nhiệt độ thích hợp nhất cho nấm men phát triển).

c) Kiểm tra mức độ tác dụng của DG và vitamin A:

Các tế bào nấm men còn sống sau khi xạ lý DG và vitamin A được cấy lại thành giống tươi rồi được cấy chuyển 3 lần liên tiếp, sau đó kiểm tra lại khả năng bền vững với UV của chúng.

-- Cấy nấm men qua một dụng cụ cấy truyền gọi là replicator: pha dịch huyền phù rồi hút

nhỏ vào các lỗ của replicator 0,1ml; dùng phần vỏ rỗng của replicator khuấy đều rồi đóng lên các hộp petri khác nhau; có một hộp petri đối chứng (không chiếu UV) của các hộp petri khác được chiếu UV ở liều lượng 5 giây, 10 giây, 15 giây, 20 giây. Các lỗ xung quanh cấy nấm men sau khi đã được xử lý DG hoặc vitamin A, còn các lỗ ở giữa cấy nấm men ban đầu chưa chiếu UV và chưa được xử lý DG hoặc vitamin A và 1 lỗ cấy một nôi nấm men đại bền vững với UV (nôi TM 30-1a) đánh giá bằng sự phát triển của nấm men trên các ô cấy của replicator.

— Kiểm tra số lượng cụ thể: không cấy qua replicator mà chiếu UV ở liều lượng 5 giây, 10 giây, 15 giây, 20 giây rồi cấy lên các hộp petri; đếm số lượng khuẩn lạc xuất hiện sau 48 giờ dựa vào petri đối chứng (không chiếu UV) để tính số lượng % sống sót.

#### KẾT QUẢ THU ĐƯỢC:

— Các nôi nấm men MG79 (red2), MG81 (red4), MG82 (red18) và MG95 (red2):

— Ô 10 đối chứng 1 (không chiếu UV) nấm men mọc khỏe.

— Ô 10 đối chứng 2 (chiếu UV không xử lý gì) nấm men chết 100%.

— Ô 10 thí nghiệm được xử lý DG nấm men mọc khỏe, số lượng cao.

— Ô 10 thí nghiệm được xử lý vitamin A nấm men mọc khỏe nhưng số lượng ít hơn ô xử lý bằng DG.

— Nôi MG81 (red1) là đối chứng mọc khỏe bình thường, các ô khác chết 100%.

— Các ô thí nghiệm chỉ được xử lý bằng Tween80 hoặc chỉ bằng mineral oil đều chết 100%.

— Các ô thí nghiệm xử lý DG và vitamin A pha bằng Tween80 không có gì khác biệt so với ô xử lý bằng DG hoặc vitamin A pha bằng mineral oil.

— Ô nồng độ 1/80 cả DG và vitamin A bắt đầu có tác dụng, nhưng DG ở nồng độ 1/20

có tác dụng mạnh nhất, còn vitamin A phải ở nồng độ 1/10 mới tác dụng mạnh nhất.

— Lấy ví dụ 1 nôi: MG79 (red2) (ảnh 1 và bảng 1).

Sau khi đã được xử lý DG hoặc vitamin A nấm men sống sót được cấy truyền 3 lần liên tiếp sau đó được chiếu UV để kiểm tra lại đặc tính bền vững với UV của các thế hệ nấm men mới. Kết quả cho thấy:

— Các ô có nấm men đã được xử lý DG hoặc vitamin A mọc khỏe, kín ô.

— Các ô có nấm men không được xử lý DG hoặc vitamin A chết hết hoặc mọc rất yếu.

— Các ô cấy nôi đại (TM30-1a) cũng mọc khỏe ngang bằng hoặc hơn nấm men đã xử lý DG hoặc vitamin A (xem ảnh 2).

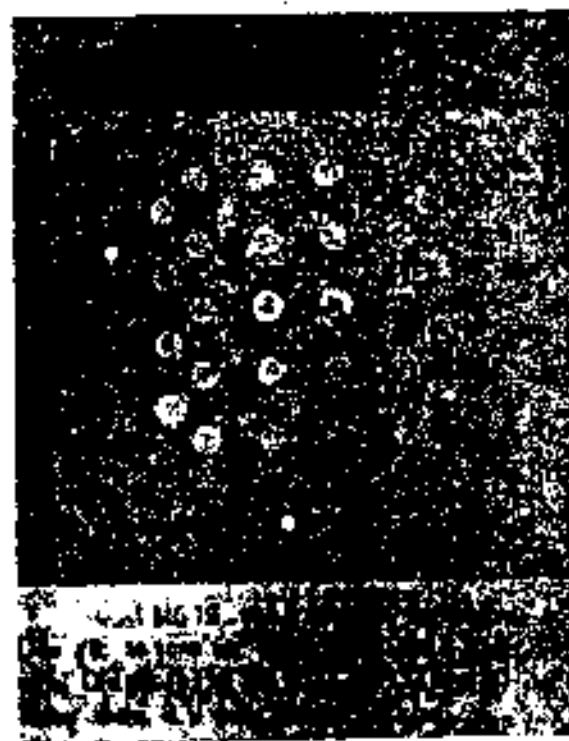
Ảnh chế: (Trong ảnh)

— Nôi đại (TM30-1a)

— Nôi MG79 (red2) không xử lý gì

Các ô xung quanh còn lại là nôi MG79 (red2) đã được xử lý DG.

Phần đánh giá số lượng cụ thể được trình bày trong bảng 1



## THẢO LUẬN

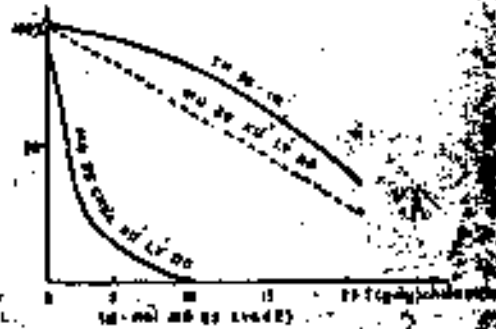
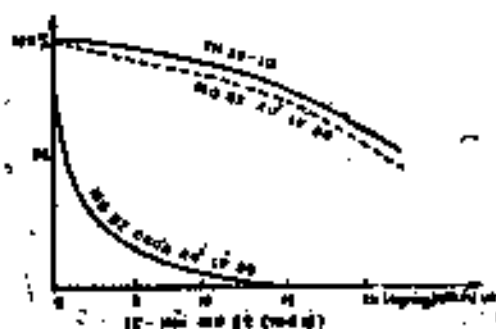
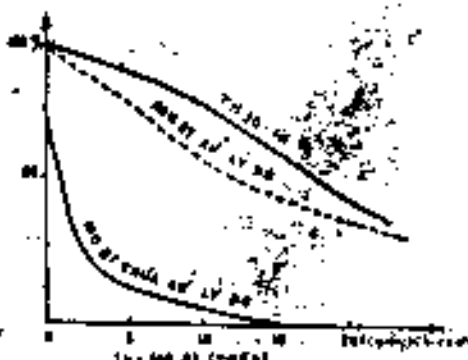
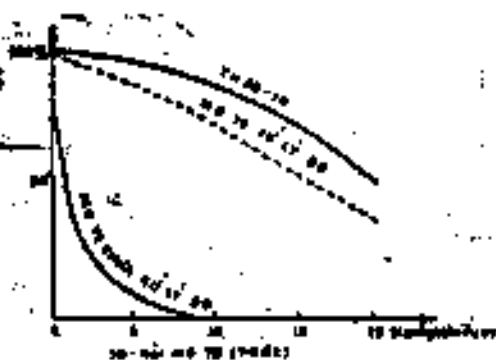
Các nòi nấm men: MG70 (rad3), MG81 (rad4), MG82 (rad10), MG83 (rad1), MG86 (rad2) là các thể đột biến về gen rad, chúng rất nhạy cảm với UV. Chỉ cần 1 liều lượng UV nhỏ nấm men sẽ bị chết.

Chiếu UV rồi đem xử lý DG hoặc vitamin A nấm men được khôi phục và tỷ lệ sống sót khá cao (xem bảng 2). Chúng tôi loại trừ ảnh hưởng của 2 loại dung môi hòa tan dầu là Tween80 và mineral oil vì ở các thí nghiệm chiếu UV chỉ được xử lý bằng Tween80 hoặc mineral oil nguyên chất thì nấm men chết 100%; có nghĩa là 2 loại dung môi này không giúp gì cho quá trình hồi phục nấm men. Một khác chúng tôi xử lý DG và vitamin A sau khi chiếu UV nên không thể nói DG và vitamin A tác dụng bằng cách tạo ra lớp màng cơ học ngăn cản sự thâm xuyên của UV.

Qua 8 lần cấy truyền liên tiếp đặc tính bền vững với UV được DG và vitamin A hồi

phục vẫn di truyền lại cho các thế hệ sau. Điều đó cho phép chúng tôi nghĩ rằng quá trình sửa chữa này không chỉ ở mức độ protein mà phải sửa chữa ở mức độ ADN tức là sửa chữa các gen rad của ADN đã bị tổn thương. Vì nếu chỉ sửa chữa ở mức độ protein thì đặc tính mới chỉ duy trì được vài ba thế hệ.

Có nhiều cơ chế khác nhau sửa chữa ADN và do nhiều chất tham gia. Trong trường hợp cụ thể này có thể DG tham gia vào một giai đoạn nào đó của quá trình sửa chữa. So sánh với vitamin A thì có thể thấy DG có tác dụng mạnh hơn, thể hiện qua tỉ lệ phần trăm sống sót, nhất là sau nhiều thế hệ cấy truyền liên tiếp được xử lý DG phát triển tốt hơn so với xử lý vitamin A. Như vậy Beta-caroten trong DG, ngoài tác dụng theo cơ chế chuyển thành vitamin A còn có thể tác dụng theo một cơ chế khác, tốt hơn, mà không qua giai đoạn chuyển thành vitamin A. Nhận xét này phù hợp với H.Peto, R.Doll và các tác giả khác.



H1.— ĐỒ THỊ BIỂU DIỄN KHẢ NĂNG SỐNG SÓT SAU KHI CHIẾU UV CỦA CÁC NÒI NẤM MEN ĐÃ XỬ LÝ DG QUA 6 TH LẦN HỆ CÂY TRUYỀN LIÊN TIẾP

## KẾT LUẬN

Hơn nữa, trong DG, ngoài Bêta-caroten, còn có nhiều chất khác nữa cùng với Bêta-caroten tạo thành một phức hợp tương hỗ cùng tham gia vào quá trình hòa chảy acid béo ADN và vì vậy DG đã có tác dụng mạnh hơn vitamin A.

Trong 5 nội nấm men dùng làm thí nghiệm số 4 nói mà ADN bị tổn thương được sửa chữa tốt, riêng nội MG83 (rad1) thì DG và vitamin A đều không có tác dụng. Có thể là ADN của chúng rất đặc biệt hoặc có một phần đơn nào đó nữa để ngăn cản tác dụng của DG và vitamin A. Vấn đề này cần được nghiên cứu thêm.

1. Dầu gốc là một chế phẩm đồng được có khả năng sửa chữa được sai hỏng ADN do tác động của tia tử ngoại gây ra. Tác dụng sửa chữa ADN của dầu gốc tốt hơn vitamin A.

2. Mô hình thử thuốc trên hệ thống các nội nấm men có genotyp xác định tỏ ra đơn giản và có hiệu quả cao. Có thể dùng mô hình này để thử cơ chế tác dụng của nhiều chế phẩm khác.

**BẢNG 1. KẾT QUẢ THU ĐƯỢC SAU KHI XỬ LÝ DẦU GỐC VÀ VITAMIN A**

CÁC NỘI TN	ĐỐI CHỨNG				THÍ NGHIỆM			
	Không chiếu UV (1)		Chiếu UV (2)		Xử lý DG		Xử lý Vitamin A	
	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/2 petri	Tỉ lệ %
MG 79 (rad2)	205 ± 5	100%	0	0 %	132 ± 3	64,4%	52 ± 2	25,3%
MG 81 (rad4)	370 ± 6	100%	0	0 %	197 ± 5	53,3%	135 ± 4	36,5%
MG 82 (rad18)	148 ± 5	100%	0	0 %	86 ± 2	58,2%	13 ± 4	49,7%
MG 93 (rad1)	153 ± 2	100%	0	0 %	0	0 %	0	0 %
MG 95 (rad 2)	120 ± 3	100%	0	0 %	92 ± 2	75,5%	90 ± 3	75%

**BẢNG 2 : KHẢ NĂNG SỐNG SÓT KHI CHIẾU UV CỦA CÁC NỘI NẤM MEN ĐÃ XỬ LÝ DG QUA 5 LẦN CẤY TRUYỀN LIÊN TIẾP**

CÁC NỘI TN	Không chiếu UV		Chiếu UV 5 giây		Chiếu UV 10 giây		Chiếu UV 15 giây		Chiếu UV 20 giây	
	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %	Số lượng TB/1 petri	Tỉ lệ %
	MG 79 (rad 2)	240 ± 5	100%	150 ± 2	62,5%	121 ± 2	50,8%	119 ± 3	49,5%	115 ± 4
MG 81 (rad 4)	920 ± 10	100%	500 ± 5	54,3%	301 ± 2	32,9%	100 ± 3	10,9%	50 ± 2	5,4%
MG 82 (rad 18)	704 ± 6	100%	700 ± 5	99%	520 ± 8	74%	150 ± 5	21%	50 ± 3	7,1%
MG 95 (rad 2)	152 ± 3	100%	125 ± 3	80,3%	110 ± 3	70,2%	85 ± 2	50,6%	42 ± 2	27,7%

## DNA-REPAIRING CAPACITY OF A DRUG USED IN VIETNAM

Mai Hong Bang, Lê Đình Lương, Hà Văn Mậu—Dept. of genetics—Univ. of Hanoi

A set of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* carrying both UV— and X—ray sensitive mutations (rad genes) were used in experiments. A drug of traditional medicine from monocotyledon in Vietnam rich in vitamin A was added for checking its DNA repairing capacity. It was shown that all UV—sensitive mutants as well as part of X—ray sensitive mutants which were tested, after treatment with the drug, became nonsensitive to radiation as wild type and this change was constant for many next generations.

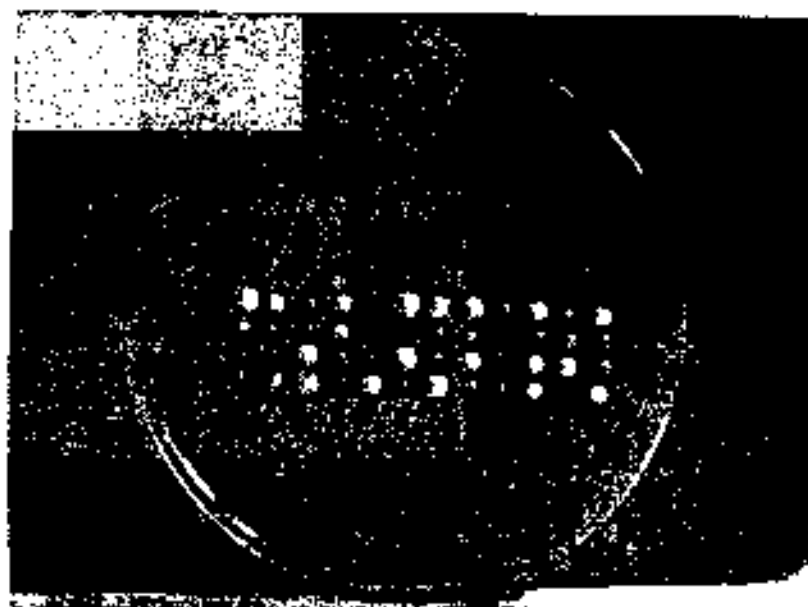
## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Lương, Di Truyền học vi sinh vật Hà Nội—1970.
2. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiên, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mừu, Phạm Văn Ty. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập III.
3. Nguyễn Lân Dũng, Bùi Xuân Dũng, Lê Đình Lương; Vi nấm, Nhà xuất bản KHKT—1962.
4. Đinh Ngọc Lâm, Cây gấc, Nhà xuất bản Nông nghiệp—1966.
5. Fred Sherman, Gerald R.Fink, James B.Hicks; Methods in yeast genetics; New York 11724.
6. Robert K.Mortimer and David Schild; Genetic Map of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews, Dec., 1960, P. 519—571, Vol. 44, No.4.
7. W.J.P. Matawaring, J.H.P. Qrish, J.D.Pickering, N.H. Mann. Prokaryotic DNA, replication, repair and recombination. Nucleic acid, Biochemistry and Molecular Biology.
8. S.G.Ings, Vechtomov, S.A.Kozin; Comparison of the specificity of ultra—Violet and X—rays action on mutability of yeast.
9. R.Feto, R.doll, L.D. Buckley, M.B.Sporn; Can dietary beta—Carotene materially reduce human cancer rates?  
Nature, vol. 280, 19 March 1981.
10. Nicholas Wald, Mariamé Idja, Julian Borsham; low serum vitamin A and subsequent risk of cancer (Preliminary results of Perifetive study).  
The lancet, Saturday 18-10-1980, P. 813—815.
11. Nguyễn Đán, Dầu gấc (oleum momordicae) 1880.

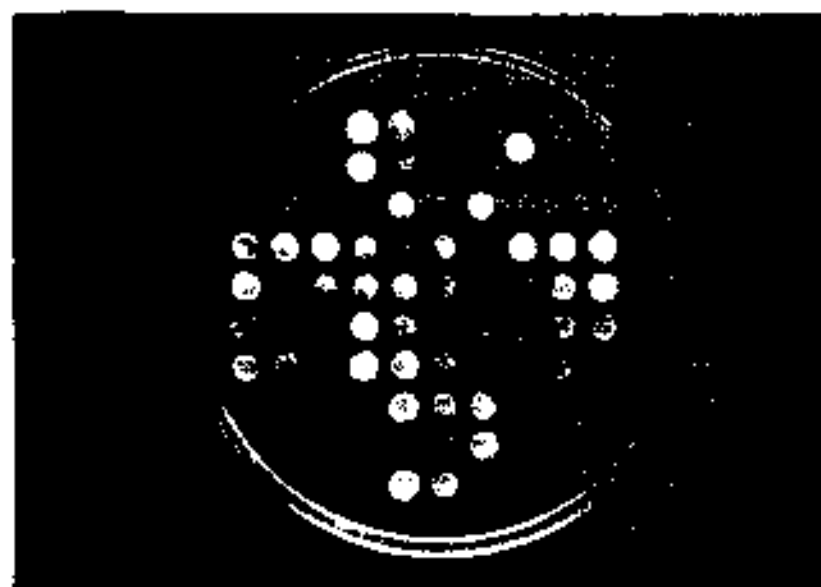
P H U      L U C  
  .            .



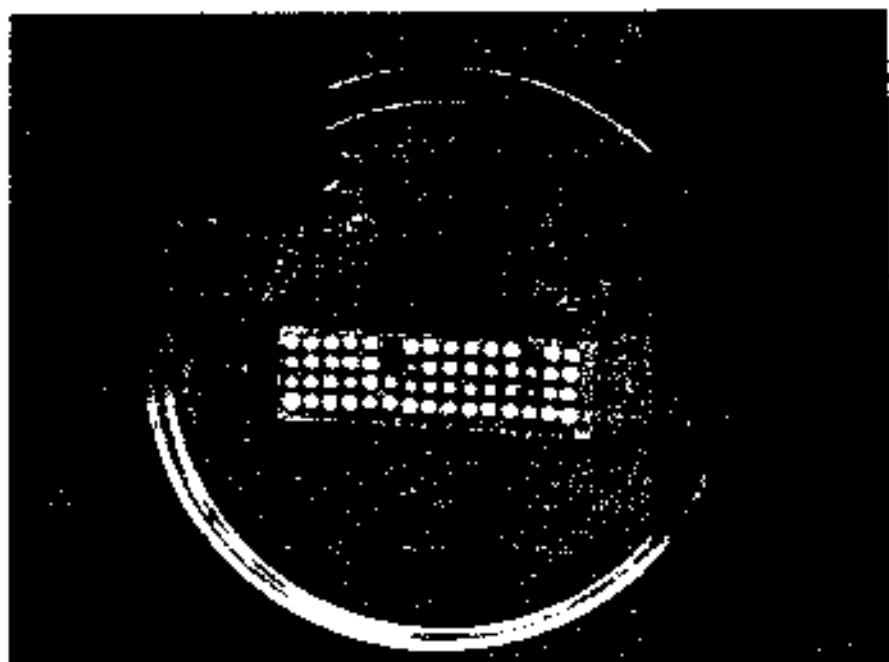
Sự phân li 2 : 2 về khả năng tích lũy sinh khối ở nòi TH 4 chứng tỏ có 1 gen trên nhiễm sắc thể xác định tính trạng này .



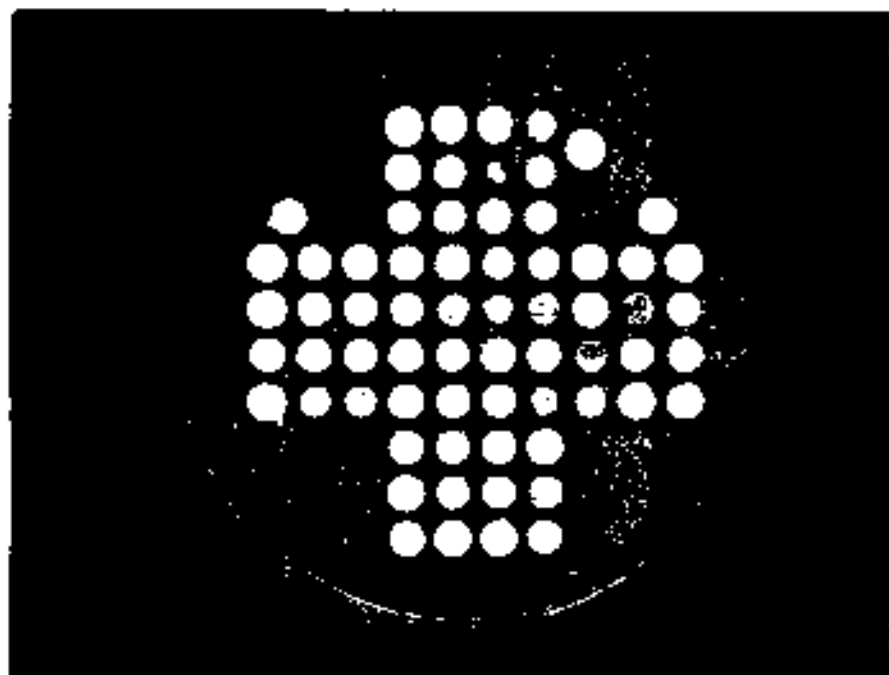
Sự phân li 2 : 2 về màu sắc khuẩn lạc



Sự phân li về tính chịu nhiệt ( 42°C ) của nòi TH 4



Các bộ bốn bào tử tách ra từ các nang đẻ phân tích di truyền



Các thể phân li mọc trên môi trường đối chứng

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

HỢP ĐỒNG TRIỂN KHAI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

gồm :

- A : Bộ môn Di truyền học, Khoa Sinh học, Trường ĐHTH Hà nội  
Do Giáo sư Lê Đình Lương , đại diện
- B : xí nghiệp In - Tráng phim Hồng anh , Hà nội  
Do ông Trần Tín , Giám đốc , đại diện

khí thảo luận , hai bên đã đi đến thỏa thuận :

- 1 . Bên A sử dụng các điều kiện thuận lợi về điện, nước , mặt bằng và trang thiết bị sẵn có của bên B như một Pilot để triển khai các kết quả nghiên cứu khoa học thuộc đề tài cấp nhà nước " Công nghệ Sinh học Nấm men" kí hiệu 52D-01-10 và đề tài hợp tác quốc tế kí hiệu VH3 D .
- 2 . Bên B bảo đảm toàn bộ yêu cầu về điện , nước , mặt bằng trang thiết bị và nhân công chi việc triển khai các kết quả nghiên cứu nói trên . Sản xuất thử và tiêu thụ thử các sản phẩm để tìm hiểu thị hiếu ở địa bàn ngoại thành .  
Tạo điều kiện thuận lợi để sinh viên có thể đến thực tập.
- 3 . Bên A cung cấp thường xuyên một số vật liệu và luôn luôn cải tiến các tiến bộ khoa học kĩ thuật . Chịu trách nhiệm về các mẫu nhãn , in nhãn cho các loại sản phẩm chế thử .
- 4 . Những nghiên cứu cải tiến kĩ thuật tiếp theo nếu đưa lại hiệu quả kinh tế thì bên A được hưởng 30% của hiệu quả đó .
- 5 . Bên B thanh toán những vật liệu do bên A đưa sang .
- 6 . Tiền thu được từ những sản phẩm chế thử sẽ được trả :
  - a) cho bên B 75% về những khoản sau :
    - bồi dưỡng nhân công tham gia .
    - mua vật liệu và khấu hao thiết bị .
    - chi phí cho thực tập của sinh viên ( nếu có ) .
  - b) cho bên A 25% để dùng cho những việc sau :
    - thuê vẽ mẫu nhãn và in nhãn .
    - bồi dưỡng nhân công tham gia .
    - nghiên cứu kĩ thuật và qui trình .
- 7 . Bên A hoàn toàn chịu trách nhiệm về vệ sinh , an toàn của các chế phẩm đang vào sản xuất thử và về các qui trình công nghệ của nó .

Điều 8. Bên B hoàn toàn chịu trách nhiệm về vệ sinh an toàn trong các quá trình sản xuất thủ ; thực hiện chính xác các qui trình công nghệ do bên A đưa vào , đảm bảo chất lượng cơ chế của các sản phẩm chế thủ . Trước khi đưa đi tiêu thụ thủ phải bảo đảm kiểm tra chặt chẽ .

Điều 9 . Hai bên có trách nhiệm đầy đủ trong việc thực hiện các điều khoản nói trên . Nếu có khó khăn thì cần gặp nhau để bàn bạc giải quyết . Hợp đồng này làm thành 4 bản , mỗi bên 2 bản . Có giá trị từ ngày 6 tháng 2 năm 1990

Hà nội ngày 01 tháng 2 năm 1990

Đại diện bên A

Đại diện bên B



GS Lê Đình Lương

GD Trần Tín

Ưởng Đại học Tổng hợp Hà Nội  
ai nhân chủ tịch của  
S Lê Đình Lương



*Handwritten signature at the bottom of the page*

## HỢP ĐỒNG HỢP TÁC NGHIÊN CỨU KHOA HỌC KỸ THUẬT

Chúng tôi gồm :

Bên A : Xí nghiệp chế phẩm Vi sinh

do KS Hoàng Thị Tình , phó giám đốc , đại diện

tài khoản : 01 - 130 - 002

Ngân hàng công thương I , Hai bà Trưng , Hà nội

điện thoại : 62981

Bên B : Bộ môn Di truyền học, Khoa Sinh học , Trường ĐHTH Hà nội

do GS Lê Đình Lương , chủ nhiệm bộ môn , đại diện

tài khoản : 229 - 076

Ngân hàng công thương Đống Đa , Hà nội

điện thoại : 44748

Sau khi thảo luận, hai bên đã thống nhất :

Điều 1 . Bên B nhận nghiên cứu và xây dựng qui trình công nghệ cho việc sản xuất các chế phẩm giàu protein giàu vitamine ... từ Nấm men ở qui mô phòng thí nghiệm . Sau đó sẽ hướng dẫn bên A thực hiện ở qui mô pilot ở bên A .

Điều 2 . Yêu cầu kĩ thuật

Cần thu được chế phẩm ở dạng dịch thể và dạng viên .

Điều 3 . Bên B có trách nhiệm thực hiện đúng tiến độ những việc sau:

	<u>thời gian</u>
- Nghiên cứu các đặc điểm sinh học của nòi Nấm men dùng để thu nhận sinh khối tại nhà máy.	7 - 8 / 90
- Nghiên cứu các điều kiện tự phân để thu được chế phẩm có hàm lượng tối đa các chất dinh dưỡng	8 - 9 / 90
- Nghiên cứu các điều kiện tự phân để làm giảm đến mức tối thiểu hàm lượng các loại axit nucleic	8 - 9 / 90
- Nghiên cứu các điều kiện để cô đặc và đóng gói.	8 - 9 / 90
- Hình thành qui trình công nghệ ở qui mô phòng thí nghiệm .	9 / 90

Điều 4 . Dưới sự hướng dẫn kĩ thuật của bên B bên A thực hiện những việc sau đây :

- Nghiên cứu sản xuất ở qui mô pilot	10 / 90
- Hình thành qui trình công nghệ ở qui mô pilot	10 - 11 /
- Đưa vào sản xuất thử ở dạng dịch thể và đóng viên .	12 / 90

Điều 5 . Bên A chịu trách nhiệm chuẩn bị toàn bộ điều kiện để triển khai ở qui mô pilot ( mặt bằng, thiết bị , vật tư , nhân công ... )

Điều 6 . Nhu cầu kinh phí

a. Thiết bị :	- Máy dập viên	2 triệu đồng
	- Máy đóng ampul	1 "
	- Hệ thống các thiết bị tự phân	10 "
	- Hệ thống các thiết bị để ổ độc ở 35°C	2 "
b. Nghiên cứu khoa học ở phòng thí nghiệm		2,5 "
c. Nghiên cứu sản xuất ở qui mô pilot		3 "

Tổng số : 20 triệu rưỡi .

Điều 7 . Bên A sẽ chuyển cho bên B số tiền là 2,5 ( hai triệu rưỡi) để chi phí cho việc nghiên cứu trong phòng thí nghiệm . Việc chuyển tiền được thực hiện thành 2 lần :

- lần 1 : 70 % số tiền , chuyển trong khoảng tháng 7 / 90
- lần 2 : 30 % số tiền , chuyển trong khoảng tháng 9 / 90 .

Thời điểm bắt đầu nghiên cứu và toàn bộ tiến độ của công việc như ở trên phụ thuộc vào thời gian chuyển tiền và việc này hoàn toàn do bên A chịu trách nhiệm .

Điều 8 . Hai bên có trách nhiệm thực hiện đầy đủ các điều khoản trên . Hợp đồng này làm thành 6 bản; Bên A giữ 4 bản, bên B giữ 2 bản .

Hà nội 15 - 6 - 1990

Đại diện bên A

Đại diện bên B

*[Handwritten signature]*

*KC Toan*  
*[Handwritten signature]*

*[Large handwritten signature]*

KS Hoàng Thị Tinh

GS Lê Đình Lương

*Phòng Đại vụ*  
*[Handwritten signature]*



*[Handwritten signature]*

1/-/OF ĐỒNG HỢP TÁC KHOA, BỒI DƯỠNG KỸ THUẬT  
=====

1) - Đề tài : Tạo giống Nấm men Bọt nũ và Nấm men *Côn*

2) - Cơ quan chịu trách nhiệm :

2.1 - Phụ trách về nội dung khoa học kỹ thuật của đề tài  
Giáo sư I Phó Tiến sĩ sinh vật học Lê Đình Lương - Trường B; môn di  
chuyển học trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, Trung tâm VSV ứng dụng.

2.2 - Phụ trách ứng dụng đề tài :

Hoàng Thị Fính Phó Giám Đốc Kỹ thuật Xí nghiệp chế biến Bột Mỳ T.Mai

3) - Mục tiêu : Về lâu dài hợp đồng này mở đầu cho sự hợp  
tác giữa Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội và xí nghiệp chế biến Bột Mỳ  
Tương Mại, nhằm thường xuyên duy trì và nâng cao hoạt động của các  
giống Nấm men đang sản xuất của nhà máy, trước mắt trong khuôn khổ  
của hợp đồng này, các mục tiêu cụ thể được đặt ra là :

3.1 : Tạo khối men sinh khối cao dùng để làm nở bột nũ  
ở điều kiện tiêu chuẩn của nổi lên men .

3.2 : Nghiên cứu tạo nổi Nấm men để tiêu hóa để sau này  
dùng làm cốm men ở điều kiện tiêu chuẩn của nổi lên men .

3.3 : Cung cấp các giống Nấm Men trên cho sản xuất .

4) - Một số điểm cần chú ý :

4.1 : Sinh khối cao : Tạo ~~được~~ được nổi Nấm men có  
chỉ tiêu sinh khối cao ở điều kiện tiêu chuẩn .

$t^{\circ} = 28 - 30^{\circ}C$  , PH 5 - 6 , độ cồn = 1%  
sinh khối từ 30-gam/lít trở lên .

4.2 : Men cốm : ở điều kiện lên men chuẩn .

$t^{\circ} = 25 - 30^{\circ}C$  , PH 5 - 6 , độ cồn ( 1%  
sinh khối thu được 60 % trở lên so với nổi cho sinh khối cao - tiêu  
hóa dễ dàng trong dạ dày người và động vật .

5) - Các bước tiến hành :

5.1 - Các giai đoạn từ tháng 02/1986 → 5/1986

04/1986 → 2/1987

6) - Thời gian thực hiện : Một năm từ 2/1986 → 2/1987

7) - Các bước cụ thể :

7.1 - Lựa chọn những nổi của cả 2 bên

7.2 - Điều tra cơ bản ( nghiên cứu các đặc tính sinh lý  
và sinh hóa của các giống nấm men cổ sẵn và giống lai-hình loại .

- 7.3 - Sơ sình các khâu nội ở địa điểm sản xuất nhỏ
- 7.4 - Tối ưu học mỗi trường trong điều kiện nguyên liệu
- 7.5 - Quy định mỗi trường (lưu trữ máy đến tháng 5/1986)
- 7.6 - Quy định mỗi trường (lưu trữ máy đến tháng 5/1986)
- 7.5 - Quy định mỗi trường (lưu trữ máy đến tháng 5/1986)
- 7.6 - Ứng dụng các giống mới vào sản xuất các nhà máy.
- 8) - Các cơ quan tham gia và phân công:

- 8.1 - Bộ môn di truyền Trường Đại học Tổng hợp thực hiện phần: 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5.
- 8.2 - xí nghiệp chế biến vật tư tương lai thực hiện phần: 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5.

- 9) - Tham gia đầu tư:
- 9.1 - Bộ môn di truyền Trường Đại học Tổng hợp đầu tư thiết bị hóa chất thí nghiệm.
- 9.2 - xí nghiệp chế biến vật tư tương lai đầu tư thiết bị nguyên liệu cho sản xuất thử.

- 10) - Đề kiến kết quả:
- 10.1 - Xác định được các thông số kỹ thuật của các giống mới có sẵn của cá bơi bần - định loại - chọn lựa.
- 10.2 - Xác định được mỗi trường tối ưu dùng cho nuôi nếm men đưa vào sản xuất.
- 10.3 - Quy định được các nội dung men mới bằng phương pháp di truyền đạt các chỉ tiêu kỹ thuật yêu cầu.

- 11) - Đề kiến chi phí:
- 11.1 - xí nghiệp chế biến vật tư tương lai chuyển cho bộ môn di truyền Trường Đại học Tổng hợp 8.000 đ (tám ngàn đồng) trong đó tháng 4/1986 chuyển 5.000 đ (năm ngàn đồng) và tháng 2/87 chuyển 3.000 đ (ba ngàn đồng).

- 12) - Thời gian kết quả: Thời gian cuối hợp đồng hai bên tổ chức tổng kết sẽ tại vào tháng 2/1987.
- 13) - Quan kết: Các cơ quan tham gia có nhiệm vụ thực hiện đúng những điều đã qui định trên đây trong trường hợp có những trở ngại cần thông báo ban học để giải quyết.
- 14) - Hợp đồng này được đánh máy 6 bản - Trường Đại học Tổng hợp gửi 3 bản - X/N chế biến vật tư tương lai gửi 3 bản.

Thay mặt phụ trách ứng dụng  
đề tài

*Chữ viết tay: Lê Đình Lương*

1) / Ngày 20 tháng 2 năm 1986  
Thay mặt phụ trách về phía  
Khoa học của đề tài  
CTV khoa học Trung tâm VSV

*Chữ viết tay: Lê Đình Lương*  
GS. Lê Đình Lương

Số: \_\_\_\_\_ / HB/AT

**HỢP ĐỒNG HỢP TÁC KHOA HỌC KỸ THUẬT**

- Căn cứ Nghị định số 14/CP ngày 10 tháng 3 năm 1975 của Hội đồng chính phủ ban hành về điều lệ và chế độ hợp đồng kinh tế.
- Căn cứ Nghị định 144/CNTP của Bộ công nghiệp thực phẩm.

Chúng tôi gồm:

- Một bên : NHÀ MÁY CHIẾ BIẾN THUỐC PHẨM HÀ NỘI  
Địa chỉ: 25 - Phước Hòa - Khuê Trung - Hà Nội.  
Số Tài khoản: 01 - 158 - 02 tại ngân hàng thành phố Hà Nội  
Đo ông : Lê Ngô Chức vụ : Giám đốc đại diện.
- Một bên là Bộ môn di truyền khoa sinh vật trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.  
Đo ông tại: 90 Nguyễn Trãi, Thượng Đình, Hà Nội.  
Chức vụ : Lê Đình Lương, chức vụ: GSI, chủ nhiệm Bộ môn, đại diện.

Sau khi thảo luận hai bên thống nhất:

**ĐIỀU 1:** Bộ môn di truyền khoa sinh vật trường Đại học Tổng hợp là Hội nhận lại tạo nên giống rượu cho nhà máy chế biến thực phẩm Hà Nội. Sau khi hoàn thành bộ môn sẽ giao giống cho nhà máy CBFP Hà Nội.

**ĐIỀU 2:** Điều kiện và yêu cầu kỹ thuật:  
Giống nên sau khi lai tạo có những đặc điểm sau:  
- Chiều cao độ cao 15-20cm  
- Độ độ phủ tương ứng 10-15g  
- Nhiệt độ 1,50 - 40°C  
- PH = 3,5 đến 4,5  
Bộ môn di truyền chịu trách nhiệm bảo đảm các đặc điểm này qua giống nạc xem trong thời gian thử nghiệm cũng như sản xuất sau này.

**ĐIỀU 3:** Bên đặt hàng có trách nhiệm lo tiền thuê xe, nơi ăn ở cho bộ môn di truyền mỗi năm 3 lần, 2 người đi làm việc tại nhà này. Nhà máy chịu chi phí trong khâu sản xuất thử nghiệm sau khi hoàn thành việc sản xuất giữ và cách đi có kế hoạch nhà máy sẽ trả cho bộ môn 100% số tiền lãi lợi do việc đại diện này được lợi (trong thời gian 1 năm kể từ khi kết thúc đợt sản xuất thử ( làm việc liên tục trong 1 năm - 300 tấn vật ri ) -

Hình thức thanh toán: Theo thể lệ hiện hành.

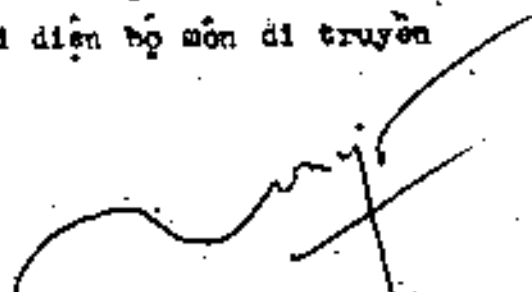
Điều 4: Hai bên có trách nhiệm thực hiện đầy đủ và nghiêm túc các điều khoản đã thống nhất ghi trong hợp đồng.

Nếu trong quá trình thực hiện có khó khăn hoặc trở ngại gì các phía thay đổi phải gặp nhau để bàn bạc giải quyết.

Hợp đồng này làm thành 4 bản, mỗi bên 2 bản. Có giá trị kể từ ngày 01 tháng 12 năm 1987.

Ngày 20 tháng 11 năm 1987

Đại diện bộ môn di truyền



GS. Lê Đình Lương

Kế toán trưởng

Hà Nội, ngày 10 tháng 10 năm 1987

Đại diện nhà máy CBTP Hà Nội



Lưu Văn Khoa

Kế toán trưởng



Lưu Văn Khoa

### CHƯƠNG TRÌNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC I

Đề tài : Chọn giống nấm men bằng các phương pháp tái tổ hợp di truyền

Cơ quan chịu trách nhiệm :

2.1 . Phụ trách về nội dung khoa học của đề tài :

- Giáo sư I Phó tiến sĩ sinh vật học Lê đình Lương
- Trưởng bộ môn Di truyền học Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội

2.2 -Phụ trách tổ chức thực hiện đề tài :

- Giáo sư I Phó tiến sĩ sinh vật học Nguyễn Văn Uyên
- Giám đốc Trung tâm sinh học thực nghiệm Phân viện khoa học Việt nam thành phố Hồ chí Minh .

Mục tiêu :

- 3.1. Đào tạo sinh viên và nghiên cứu sinh chuyên ngành di truyền chọn giống nấm men
- 3.2. Xác định vị trí của các gen có liên quan đến các tính trạng kinh tế như chịu nhiệt độ cao, chịu pH thấp, chịu nồng độ đường cao, tích lũy sinh khối lớn v.v...
- 3.3. Cung cấp các giống nấm men mang các đặc điểm kinh tế quý cho thực tế sản xuất .

Các bước tiến hành :

- 4.1. Phân lập các nòi nấm men có các đặc điểm kinh tế quý từ các nguồn trong thiên nhiên .
- 4.2. Nghiên cứu các đặc tính sinh lý sinh hóa của các nòi đã phân lập và định loại
- 4.3. Phân tích di truyền học các tính trạng trên
- 4.4. Lai hữu tính .
- 4.5. Dung hợp tế bào nấm men .
- 4.6. Chuyển plasmit giữa các nòi khác nhau.
- 4.7. Tạo các plasmit mang gen đã xác định và tiến hành biến nạp
- 4.8. Thử trên quy mô phòng thí nghiệm các nòi nấm men có các genotyp khác nhau đã xác định .
- 4.9. Thử trên qui mô sản xuất nhỏ và đưa vào sản xuất lớn

Các cơ quan tham gia và phân công :

- 5.1. Bộ môn di truyền học Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội thực hiện phần 4.3,4.4,4.5,4.6,4.7

5.2. Trung tâm Sinh học thực nghiệm phân viện khoa học Vietnam, Thành phố Hồ Chí Minh thực hiện phần 4.1, 4.2, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9.

5.3. Trung tâm nghiên cứu Vi sinh vật học ứng dụng Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội thực hiện phần 4.1, 4.2.

) Tham gia đầu tư :

6.1. Bộ môn Di truyền học đầu tư thiết bị hóa chất hiếm và giống cần nhập từ nước ngoài.

6.2. Trung tâm Sinh học thực nghiệm đầu tư thiết bị, hóa chất và các khoản chi tiêu khác bằng tiền Việt Nam.

6.3. Trung tâm nghiên cứu Vi sinh vật học ứng dụng đầu tư thiết bị hóa chất, cán bộ tham gia thực hiện đề tài.

) Thời hạn thực hiện đề tài : 1986-1990

) Dự kiến kết quả :

8.1. Mỗi năm đào tạo 1-2 sinh viên chuyên ngành di truyền chọn giống nấm men.

8.2. Sau 5 năm đào tạo 2-3 phó tiến sĩ về chuyên ngành Di truyền chọn giống nấm men.

8.3. Định vị được các gen chịu nhiệt độ cao, chịu pH thấp vv... trên bản đồ di truyền. Mỗi năm định vị được 1 gen.

8.4. Cung cấp những nơi có giá trị kinh tế cho sản xuất

8.5. Đưa ra các quy trình công nghệ sản xuất nấm men trên cơ sở các giống nấm men đã tạo được với các đặc tính kinh tế

8.6. Công bố các kết quả nghiên cứu dưới dạng các bài báo trên các tạp chí trong và ngoài nước với sự thỏa thuận của các bên tham gia.

) Dự kiến chi phí :

9.1. Nguồn đầu tư : Trích một phần các đề tài đăng ký với nhà nước, Các hợp đồng nghiên cứu sản xuất.

9.2. Tổng số chi phí : 1500000<sup>d</sup> (tiền Việt Nam)

mỗi năm : 300000<sup>d</sup> (tiền Việt Nam)

9.3. Dự kiến thu hồi : 1000000<sup>d</sup> (tiền Việt Nam)

Mỗi năm : 200000<sup>d</sup> (tiền Việt Nam)

Tài liệu và học thuật :

10.1. Tổ chức 2 thư viện chuyên ngành di truyền và di truyền nấm men tại bộ môn Di truyền học Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội và tại Trung tâm nghiên cứu Sinh học ứng dụng.

10.2. Tổ chức hội thảo khoa học để thông báo các kết quả

ngiên cứu ở tháng 1 lần tại Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh.

1.1) Cam kết :

Các cơ quan tham gia có nhiệm vụ thực hiện đúng những điều đã quy định trên đây. Trong trường hợp có những trở ngại cần thông báo bằng văn bản để giải quyết.

Ngày 21 tháng 10 năm 1985

Thay mặt  
Cơ quan phụ trách tổ chức  
hiện đề tài,

Thay mặt  
Cơ quan phụ trách nội dung Khoa  
học của đề tài.

Giáo sư I Phó tiến sĩ sinh vật học  
Trưởng bộ môn Di truyền học  
Viện nghiên cứu phân viện KHVN  
thành phố Hồ Chí Minh

Giáo sư I Phó tiến sĩ sinh vật học  
Trưởng bộ môn Di truyền học  
Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội



TIỀN - VAN - UYÊN

LÊ - ĐÌNH - LƯƠNG

ĐIỀU KIỆN SỐ SÁNH CÁC NỘI NẾP HƯN LẠI DO BỘ MÔN DI TRUYỀN HỌC ĐN TỔNG HỢP  
 HÀ NỘI TẠO RA VỚI NỘI NẾP ĐANG ĐƯỢC TẠI TRUNG TÂM SINH TP. HỒ CHÍ MINH 100

TÊN NỘI	SINH	KHỐI	LY TÂM (M)	CO <sub>2</sub> (PHÚT)
	90	550	7	160
	- 50	- 20	4,5m	60
H <sub>1</sub>	0.00	0.125		60
H <sub>11</sub>	0.04	0.14		35
H <sub>17</sub>	0.075	0.095		26
BH	0.04	0.07		

**CHÚ THÍCH :**

- H<sub>1</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>17</sub> là các nội nếp hưn lại của bộ môn Di truyền học, ĐN Tổng hợp Hà Nội.
- BH là nội nếp hưn đang được ở Trung tâm Sinh học thực nghiệm TP. Hồ Chí Minh.
- Phương pháp sử dụng tại Khoa Công nghệ Di truyền, Trung tâm SINH ĐO KỸ THUẬT VIÊN NGUYỄN THẠNH TRÍ thực hiện.

Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 5 tháng 3 năm 1987.

Người làm thí nghiệm

1. Lê Duy Khải *Leduykhai*

2. Lê Thành Lân *Lethanhlan*

Xác nhận chủ ký của  
 Lê Duy Khải  
 Phó Giám Đốc



13/03/1987

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập Tự Do Hạnh Phúc

G T Á Y C HỨ N G K H A N

Cô là Phạm Thành Hồ, trưởng phòng Sinh học phân tử, khoa Sinh học, Trường Đại học Tổng hợp TP Hồ Chí Minh, đã nhận từ ông Lê Đình Long, trưởng phòng Sản phẩm truyền học trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, phần giống men loại *Saccharomyces cerevisiae* nòi GH 44 để chuyển giao cho phòng sản xuất nấm men bánh mì 'Phi Mã' TP Hồ Chí Minh.

Hàng nội lai này, giống Phi Mã đã sản xuất 3 tạ men /ngày trong suốt thời gian 4 tháng, từ tháng 1 đến tháng 4 năm 1990 là thời kỳ nhiệt độ thay đổi lớn và liên tục, trong khi các nòi nấm men khác của thành phố nóng suất bắp bết, chất lượng giảm sút thì nội nói trên có những ưu điểm nổi bật như sau :

- 1) Sản lượng được biên độ thay đổi nhiệt độ lớn mà chất lượng vẫn giữ nguyên.
- 2) Hàng suất cao ổn định.
- 3) Ngoài dùng để sản xuất bánh mì, giống men lai GH 44 còn có thể dùng rất tốt để sản xuất cồn, nước giải khát có ga cũng với những ưu điểm nêu trên.

Ngày 27 tháng 10 năm 1990

Ký tên

Phạm Thành Hồ

Khai nhận chú ký  
ĐTC Phạm Thành Hồ?  
Ngày 20/10/1990

STP. 20/10/1990

KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM MÁU DỊCH CHIẾT MÀM MÈN

Người gửi mẫu : Chị Phạm Kim Trang, Lê Thành Lân.  
 Nơi gửi : Bộ môn di truyền, Khoa sinh, trường ĐHTH-HN  
 Yêu cầu : Xác định hàm lượng các vitamin

KẾT QUẢ

Loại vitamin	Hàm lượng (mg/lít)
Vitamin B <sub>1</sub>	6,3
Vitamin B <sub>2</sub>	5,0
Vitamin C	22
Vitamin B <sub>3</sub>	277,8
Vitamin B <sub>5</sub>	138,7
Vitamin B <sub>6</sub>	Vết
Vitamin D <sub>2</sub>	0,03
Vitamin E	0,02
Vitamin K <sub>1</sub>	3,2
Vitamin A. pal.	1,8
Caroten	Không có

Chức vụ  
 Khoa - CB Kim Hoa

Ngày 28.11.1990



Đỗ Văn Chính

Hà Nội ngày 8/10/1990

Chủ nhiệm phòng thí nghiệm VH<sub>2</sub>  
 Dr. Phạm Luận

*Phạm Luận*

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự Do - Hạnh Phúc  
\*\*\*\*\*

SỞ Y DƯỢC GIA CHẤT LƯỢNG KHEN HI  
TRUNG TÂM KIỂM NGHIỆM Y 6 Thí nghiệm  
tại xí nghiệp Lĩ T. Huế

Bộ tiêu bình kiểm tra về thử nghiệm nổi hi vào sữa xuất  
bình mi chúng tôi đã dựa vào tiêu chuẩn qui định chung về chất  
lượng sữa tiêu chuẩn của WHO (bức) để đánh giá chất lượng sữa  
đồng thời chúng tôi đã chọn sữa Khô là một loại sữa  
được coi là sữa có chất lượng tốt nhất để làm mẫu đối chứng so  
sánh, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm nổi hi và đo độ pH của  
sữa xuất ở qui mô nhỏ như sau : ( bảng 1 )

I) - Biểu hiện thử nghiệm :

Tên nổi	Loại sữa (g)	Thời gian nổi (phút)	Tỷ lệ sữa nổi (%)	Đường hoạt độ	Độ pH
H	5000	13,1	11,5 theo mẫu	0,6	0,8
F	5000	13,1	10,2% khô	0,9	0,8

II) - Kết quả mô hình thử nghiệm như ở bảng 2 :

Tên nổi	Thời gian nổi (phút)	Độ nổi (%)	Độ pH
H	133'	100%, đồng, đẹp	tốt
F	165'	không nổi	tốt

Song song chúng tôi đã kiểm tra mẫu trong tạo sữa  
của mô hình thí nghiệm trên trong phòng thí nghiệm kết quả cho  
thấy ở bảng 3 .

Tên nổi	Nở lần 1 (phút)	Nở lần 2 (phút)	Nhận xét
H	70 phút	135'	đạt
F	113'	177'	không đạt

Lật ngược chúng tôi tiến hành lấy kiểm tra kết quả  
tại các qui mô hi và làm chấp trong điều kiện chuẩn của phòng  
thí nghiệm kết quả cho thấy ở bảng 4 .

Tỷ lệ (%)	nhỏ hơn	phần	1000(ml)	phần	1000(ml)	phần	1000(ml)	phần	1000(ml)	phần	1000(ml)
2%	90	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,57%	90	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Chất của chương

- 1) - ... chất lượng
- 2) - ... chất lượng
- 3) - ... chất lượng
- 4) - ... chất lượng
- 5) - ... chất lượng
- 6) - ... chất lượng
- 7) - ... chất lượng
- 8) - ... chất lượng
- 9) - ... chất lượng
- 10) - ... chất lượng

*Giám đốc Kỹ thuật*



*Phạm Văn Thiệu*

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

## TỜ KHAI XIN CẤP BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH

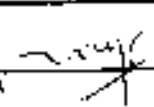
Kính gửi: Cục Sáng chế - Ủy ban Khoa học Nhà nước  
96-98 Nguyễn Trãi Hà Nội (ĐT: 43069, 43793, 43425)

Mô tả đơn (tên, địa chỉ, ĐT): Bộ môn Di truyền học  
Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội  
90 Nguyễn Trãi Hà Nội, ĐT: 44748

là người thừa kế hợp pháp tác giả  
là người được chuyển nhượng quyền sở hữu của \_\_\_\_\_

Người đại diện (tên, địa chỉ, ĐT): \_\_\_\_\_

### CÁC GIẢI PHÁP:

Họ và tên	nam/nữ	Quốc tịch	Trình độ chuyên môn	Nơi công tác	Địa chỉ liên lạc	Chữ ký tác giả
<u>Đình Lương</u>	<u>nam</u>	<u>VN</u>	<u>Giáo sư I</u>	<u>ĐHTH Hà Nội</u>	<u>118c Thủ Khoa</u>	

NGIẢI PHÁP: Qui trình sản xuất nước giải khát có ga hai giai đoạn  
bên trong chai.

5) Phân loại sáng chế của giải pháp: \_\_\_\_\_

Yêu cầu được hưởng quyền ưu tiên theo:

với ngày ưu tiên (23)

(33) Nước nộp đơn đầu tiên (32) Ngày nộp đơn đầu tiên

(31) Số đơn đầu tiên

OAi pháp tạo ra liên quan đến nhiệm vụ được giao bằng cơ quan, đơn vị không làm thủ tục đăng ký theo qui định

Tôi/Chúng tôi/Cơ quan, đơn vị của các đơn vị khai đồng ý một.

**TÀI LIỆU KÈM THEO:**

Bản mô tả giải pháp hữu ích

Yêu cầu bảo hộ giải pháp hữu ích

Bản vẽ, sơ đồ

Bản tóm tắt giải pháp hữu ích

Chứng từ nộp lệ phí

Các tài liệu khác:

trang

trang

khả

trang

trang

bản

bản

bản

bản

bản

Khai tại ..... ngày ..... tháng ..... năm .....

Người nộp đơn/Người đại diện

(Ký tên và đóng dấu nếu có)

**LƯU Ý:** Đánh dấu "X" vào ô

đóng  nếu có

**ỦY BAN KHOA HỌC NHÀ NƯỚC**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**

**CỤC SÁNG CHẾ**  
96-98, Nguyễn Trãi, Hà Nội  
Số 608 /XNSC

**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Hà Nội, ngày 08 tháng 11 năm 1990

Kính gửi: Kường đại học tổng hợp  
Hà Nội - Bộ môn di truyền

**GIẤY BIÊN NHẬN ĐƠN XIN CẤP  
BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

Tên giải pháp : Qui trình sản xuất nước giải

khát có ga hai giai đoạn bên trong

Người nộp đơn : Kường đại học tổng hợp Hà Nội

Tác giả giải pháp : Lê Đình Lương

Người đại diện : /

Đơn xin cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích nộp ngày 08.11.90 gồm có: (đánh dấu "x" vào ô vuông, nếu có)

- Từ khai xin cấp BĐQGPHI 03 bản
- Bản mô tả GPII 05 trang 03 bản
- Yêu cầu bảo hộ GPII 02 điểm 05 trang 03 bản
- Bản vẽ, sơ đồ 01 hình 01 trang 03 bản
- Chứng từ nộp lệ phí 01 bản
- Các tài liệu khác \_\_\_\_\_

T. CỤC TRƯỞNG CỤC SÁNG CHẾ



Lê Đình Lương

# TỜ KHAI XIN CẤP BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH

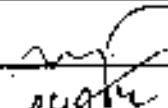
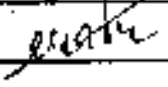
Kính gửi: Cục Sáng chế - Ủy ban Khoa học Nhà nước  
96-98 Nguyễn Trãi Hà Nội (ĐT: 43069, 43793, 43425)

Đơn nộp đơn (tên, địa chỉ, ĐT): Bộ môn Di truyền học, Khoa Sinh học  
Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.  
90 Nguyễn Trãi, Đống Đa, Hà Nội.ĐT: 4244749

là người thừa kế hợp pháp tác giả  
 là người được chuyển nhượng quyền sở hữu của \_\_\_\_\_

Người đại diện (tên, địa chỉ, ĐT): \_\_\_\_\_

## CÁC GIẢI PHÁP:

Họ và tên	nam/nữ	Quốc tịch	Trình độ chuyên môn	Nơi công tác	Địa chỉ liên lạc	Chữ ký tác giả
<u>Ê Đình Lương</u>	<u>nam</u>	<u>VN</u>	<u>Giáo sư I</u>	<u>ĐHTH Hà Nội</u>	<u>118d Thủ Lệ</u>	
<u>Ê Thành Lâm</u>	<u>nam</u>	<u>VN</u>	<u>CBCĐ</u>	<u>ĐHTH Hà Nội</u>	<u>ĐHTH Hà Nội</u>	

NGIẢI PHÁP: Qui trình sản xuất sinh khối nấm - xạ hình và  
không dùng thiết bị ôn nhiệt.

(S1) Phân loại sáng chế của giải pháp: \_\_\_\_\_

AN KHOA HỌC NHÀ NƯỚC

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

CỤC SÁNG CHẾ  
46-98 Nguyễn Trãi, Hà Nội  
Số: 702 /KNSC

Hà Nội, ngày 26 tháng 11 năm 1990

Kính gửi: Bộ môn Di truyền  
Đại học Tổng hợp - Hà Nội

GIẤY BIÊN NHẬN ĐƠN XIN CẤP BẰNG

ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ/BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH

Tên Sáng chế/GPHI: Qui trình sản xuất sinh khối nấm men

kinh tế không dùng thiết bị lên men

Người nộp đơn: Bộ môn Di truyền - ĐHTT Tổng hợp - HN

Tác giả: Lê Đình Lương - Lê Thanh Lâm

Người đại diện: \_\_\_\_\_

Đơn xin cấp Bằng độc quyền Sáng chế/Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích nộp ngày 26/11/90 gồm có: (đánh dấu "X" vào ô vuông, nếu có)

- |                                     |                                  |          |       |    |     |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------|-------|----|-----|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Tờ khai xin cấp Bằng ĐQS/ĐQGPHI: | 01       | trang | 03 | bản |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bản mô tả sáng chế/GPHI:         | 05       | trang | 05 | bản |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Yêu cầu bảo hộ:                  | điểm 11  | trang | 03 | bản |
| <input type="checkbox"/>            | Bản vẽ, sơ đồ:                   | hình     | trang |    | bản |
| <input type="checkbox"/>            | Bản tóm tắt sáng chế:            |          | trang |    | bản |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Chứng từ nộp lệ phí:             | 30.000 đ | trang | 01 | bản |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Các tài liệu khác:               |          |       |    |     |

Giấy CN đồng tác giả 01b

T. CỤC TRƯỞNG CỤC SÁNG CHẾ  
TRƯỜNG SÁNG CHẾ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH



GHI CHÚ: Gạch bỏ những chữ không sử dụng

Lê Đình Lương

BỘ NGOẠI THƯƠNG  
Cục Kiểm nghiệm Hàng hóa  
VIỆT NAM CONTROL

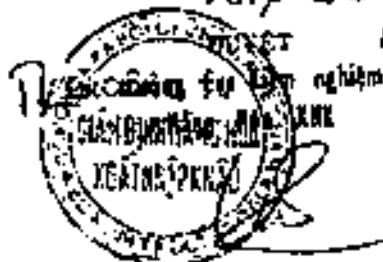
CỘNG HÒA XHCN VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Phiếu kết quả kiểm nghiệm số 173.1KN

Người xin Dai Loan đình hợp  
Tên hàng Miscel Sabon  
Số lượng khai \_\_\_\_\_ Khối lượng khai \_\_\_\_\_  
Khai hàng \_\_\_\_\_ Lấy mẫu ngày \_\_\_\_\_  
Hàng xuất đi: \_\_\_\_\_  
Theo hợp đồng số: \_\_\_\_\_  
Bản chỉ liệt đóng gói số \_\_\_\_\_

KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM

Tổng số vi khuẩn Coli sống 0/9  
Coliform 0/9  
Vi khuẩn gây bệnh typhoid 0  
E. coli 0  
Vi khuẩn kỵ khí gây bệnh 0  
Cl. perfringens 0/9  
Tổng số vi khuẩn mốc 0/9



Hà Nội, ngày 2 tháng 9 năm 1984

Kiểm nghiệm viên

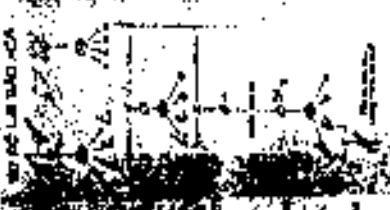
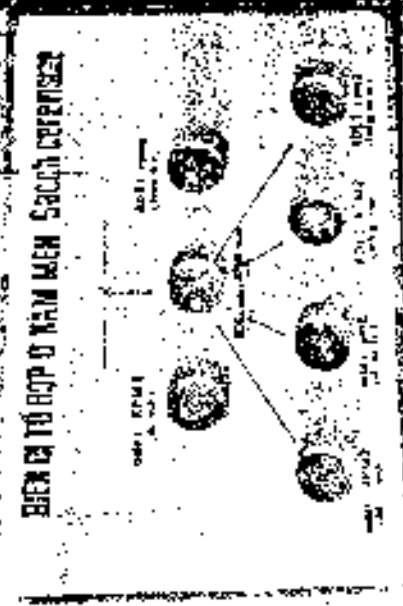
M. H. H.



Nhãn nước giải khát có ga SARDO

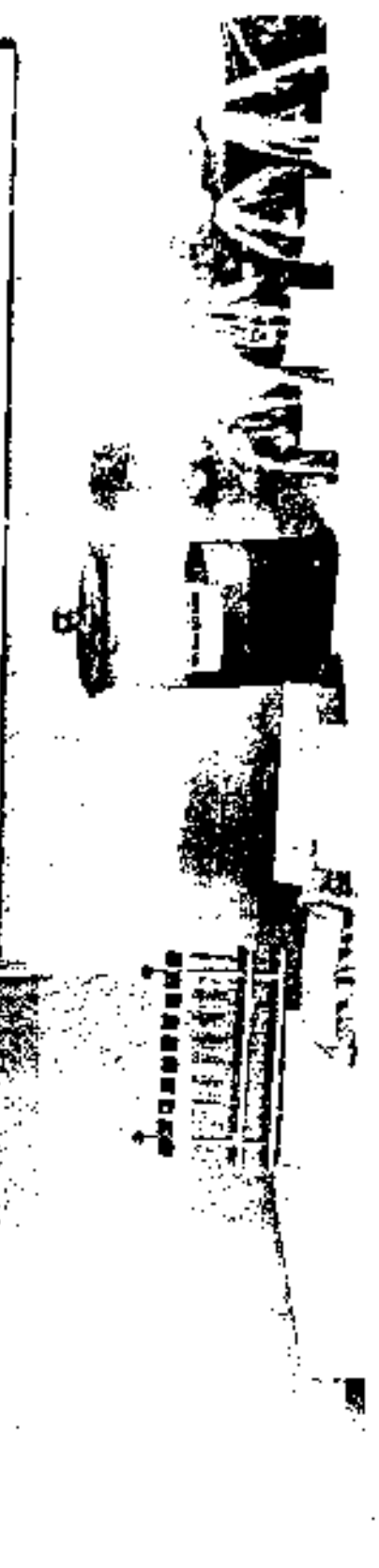
# NHUNG NOI LAI NAM MIEN DAU TIEN O VIET NAM

BO KHOA HOA VA CONG NGHIEP - KHOA SINH HOC - TRUNG TAM NGHIEN CUU VE CONG NGHIEP



MUO TIET LAM KHON CUU  
 LAI TUONG CAC HO HOC  
 KHON LUU UO 5TH NUT

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24



Triển lãm Thành tựu Kỹ thuật Việt Nam 1987

TÀI LIỆU HẠNH HỌC

1. Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm, Lê Bình Lương. Tạp chí Sinh học. 9, 7, 1987.
2. Nguyễn Lân Dũng. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. T.1. NXB KHCN. Hà Nội, 1970.
3. Nguyễn Lân Dũng, Bùi Xuân Đồng, Lê Bình Lương. Vi nấm. NXB KHCN, Hà Nội, 1982, 212.
4. Dương Văn Hợp, Nguyễn Lân Dũng. Chọn giống vi sinh vật sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp thức ăn chăn nuôi. Hà Nội, 1984, 67.
5. Nguyễn Văn Hưng, Lê Bình Lương. Tóm tắt báo cáo khoa học : Sinh học - Tảo nhuộm. Trường ĐH N Hà Nội, 1989, 4.
6. Lê Bình Lương. Di truyền học vi sinh vật. Trường ĐH N Hà Nội 1970.
7. Lê Bình Lương. Tạp chí hoạt động khoa học. Hà Nội. 6.1974.
8. Lê Bình Lương, Nguyễn Văn Hưng, Đặng Dương Bằng, Lê Thành Lâm. In Genome 30, 488, 1988.
9. Lê Bình Lương, Nguyễn Văn Hưng. Thông tin các trường đại học Hà Nội. 2, 46, 1988.
10. Nguyễn Thị Mùi, Nguyễn Lân Dũng. Chọn giống vi sinh vật sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp thức ăn chăn nuôi. Hà Nội. 1984, 27.
11. Tạ Thu Thủy. Luận văn tốt nghiệp. Trường ĐH N Hà Nội, 1989.
12. Lê Khánh Trại, Hoàng Hữu Nhu. Ứng dụng xác suất thống kê trong y, sinh học. NXB KHCN. Hà Nội, 1979.
13. Захаров И.А., Кожик С.А., Кожина Т.Н., Федорова. И.В. Обзор методов по генетике дрожжей - сахаромшечков. Л., "Наука" 1976.
14. Захаров. И.А. Курс генетики микроорганизмов Минск. "Вышшаяшая школа". 1978.
15. Захаров. И.А., Кривяцкий. А.С Радикационная генетика микроорганизмов М., Атомиздат. 1972.

16. Косиков. К.В., Мешведва. А.А. Микробиология. 47, 544, 1978.
17. Косиков. К.В. Генетические методы селекции дрожжей. Москва "Наука". 1979.
18. Производство хлебопекарных дрожжей. Для кадров массовых профессий. Москва. Пищевая промышленность. 1978.
19. Сежикатова. Н.М. Хлебопекарные дрожжи. Москва. "Пищевая промышленность" 1980.
20. Aguilera. A., Benítez. T. Arch. Microbiol. 142, 389, 1985.
21. Aguilera. A., Benítez. T. Arch. Microbiol., 143, 337, 1986.
22. Alikhanyan, S.I., Malbendyan, G.M., and Avakyan, B.P. Sov. Genet., 1, 1287, 1971.
23. Arrigo, A.P., S. Fakan, and A. Missières. Dev. Biol., 78, 86, 1980.
24. Ashburner, M., and J.J. Bonner, Cell, 17, 241, 1979.
25. Atkinson, B.G. J. Cell Biol. 89, 666, 1981.
26. Bacila. M., Horii. J. In : Bacila. M., Horecker. B.L., Stoppani. A.C.M. (eds). Biochemistry and genetics of yeasts. Academic Press, London, 1978, 121.
27. Ballinger, G.G., and M.L. Pardue. Cell 33, 103, 1983.
28. Bandas. E.L., Zakharov. I.A. Mutat. Res. 71, 193, 1980.
29. Bardwell, J.C.A., and E.A. Greig. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 81, 846, 1984.
30. Benítez, T., Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J., and Cerda - Olmedo, E. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1429, 1983.
31. Berthelin, E., J. Zucca et J - P. Mescla. Can. J. Microbiol. 31, 934, 1985.
32. Bienz, M., and J.B. Burdon. Cell, 29, 811, 1982.
33. Biotechnology in the Netherland . Export Magazine Special . June 1988 .

34. Brook. T.D. et al., Arch. Microbiol., 84, 54, 1972.
35. Brook. T.D. La Recherche. 19, 478, 1988.
36. Brown, S.W. and Oliver, S.G., Biotechnol. Lett., 4, 269, 1982.
37. Brown, S.W., Sugden, D.A., and Oliver, S. G., J.Chem. Technol. Biotechnol., 348, 116, 1984.
38. Brown, S.W. and Oliver, S.G., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16, 119, 1982.
39. Cabeça - Silva, C., Madeira - Lopes, A., and Van Uden, N., FEMS Microbiol. Lett., 15, 149, 1982.
40. Casey. G.P., Ingledew. W.M., Crit. Rev. Microbiol. 13, 219, 1986.
41. Casey. G.P., Magnus, G.A., and Ingledew. W.M., Appl. Environ. Microbiol., 48, 639, 1984.
42. Cosgrove, J.W., and I.R. Brown., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 569, 1983.
43. Cruess, W.V., Brown, E.M., and Flossfeder. F., J. Ind. Eng. Chem., 8, 1124, 1916.
44. Cruess, W.V., and Hohl, L., Wine Rev., 5, 12, 1937.
45. Cryer, D.R., R. Eccleshall, and J. Mamur., In Methods in cell biology. Vol. 12, Edited by D.M. Prescott. Academic Press, New. York, 1975, 39.
46. Gyswski, G.R., and Wilke, C.R., Biotechnol. Bioeng., 19, 1125, 1977.
47. Dawas, I.W., Hardie, I.D., Molec. Gen. Genetics, 131, 281, 1974.
48. Day, A., Anderson, E., and Martin, P.A., In Proc. 15th Conv. Eur. Brew. Cong., IRL Press, Oxford, 1975, 337.
49. De Mancilha, I.M., Pearson, A.K., Monose, H., and Pestka, J.J., Food. Chem., 14, 313, 1984.
50. Denavathan. T., et al., J. Biol. Chem., 244, 2846, 1969.

51. de Rosa, M., et al., *Microb. Reviews*, 50, 70, 1986.
52. Domenico, B.J., G.B. Bugalsky, and S.Lindquist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6181, 1982.
53. Domenico, B.J., G.B. Bugalsky, and S. Lindquist., *Cell*, 31, 593, 1982.
54. Esser, A.F., In *Strategies of life in extreme environments*, M.Shilo (ed.), Dohlem Konferenzen, Berlin. 1979.
55. Evans. R.J., Clark - Walker. G.D., *Genetics* 111, 405, 1985.
56. Evans. R.J., Oakley. K.M., Clark - Walker. G.D., *Genetics* 111, 389, 1985.
57. Farrelly, P.W., and D.B. Finkelstein., *J.Biol. Chem.*, 259, 5745, 1984.
58. Flor, P.Q., and Hayashida, S., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 148, 679, 1983.
59. Fowell. R.R., *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg. ser. physiol.*, 26, 117, 1956.
60. Grange, P., M. Ojha, and G. Turian., *Experientia*, 39, 1111, 1983.
61. Gray, W.D., *J. Bacteriol.*, 42, 561, 1941.
62. Gray, W.D., *J. Bacteriol.*, 49, 445, 1945.
63. Gray, W.D., *J. Bacteriol.*, 52, 703, 1946.
64. Guijarro, J.M. and Lagunas, R., *J. Bacteriol.*, 160, 874, 1984.
65. Guttman, B.D., C.V.C. Glover, C.D. Allia, and M.A. Gorovsky., *cell* 22, 299, 1980.
66. Hacking, A.J., Taylor, I.W.P., and Hannas, G.M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 361, 1984.
67. Hahn - Hagerdal, B., Larsson, M., and Mattison, B., *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12, 199, 1982.
68. Herman. A., Wickerham. L.J., *Genetics*. 54, 339, 1966.

69. Herskowitz, I., Oshima, Y., *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1981, 181.
70. Hickay, B., and L.A. Weber., In M.J. Schlesinger, M. Ashburner bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1982, 199.
71. Holcberg, I.B. and Margalith, P., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 133, 1981.
72. Horic, N., et al., *Biochemistry*, 24, 5711, 1985.
73. Hughes, D.B., Tudroszen, N.J., and Moye, C.J., *Biotechnol. Lett.*, 6, 1, 1984.
74. Ingolia, T.D., M.R. Slater, and B.A. Craig., *Mol. Cell. Biol.* 2, 1388, 1982.
75. Ingers, L.O., Buttke, T.M., *Adv. Microbiol. Physiol.* 25, 254, 1984.
76. Ismail, A.A. and Ali, A.M.M., *Folia Microbiol.*, 16, 346 1971.
77. Ismail, A.A. and Ali, A.M.M., *Folia Microbiol.*, 16, 350, 1971.
78. Izaguirre, M.E. and Castillo, F.J., *Biotechnol. Lett.* 4, 257, 1982.
79. Jiménez, J., and Benítez, T., *Curr. Genet.* 13, 461, 1988.
80. Jiménez, J., Benítez, T., *Curr. Genet.* 12, 421, 187.
81. Jiménez, T., Benítez, T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 150, 1986.
82. Johansson, M. and Sjöström, J.E., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 105, 1984.
83. Johnson, J.R., Mortimer, R.K., *J. Bacteriol.* 18, 292, 1959.
84. Jones, L.P., Alexander, D., and Zajic, J.E., *Dev. Ind Microbiol.*, 23, 367, 1981.
85. Jones, R.P., and Greenfield, P.F., *Biotechnol. Lett.*, 6, 471, 1984.

86. Jones, R.P., and Greenfield, P.F., *Biotechnol. Lett.* 3, 225, 1981.
87. Jones, R.P., Payment, M., and Greenfield, P.F., *Process Biochem.* 16, 42, 1981.
88. Kalmokoff, M. and Ingledew, W.M., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 43, 189, 1985.
89. Kapoor, M., *Int. J. Biochem.*, 15, 639, 1983.
90. Kelley, P.M., and M.J. Schiesinger., *Mol. Cell Biol.*, 2, 267, 1982.
91. Kloetzel, P.M., and E.K.F. Bautz., *EMBO J.*, 2, 705, 1983.  
*EMBO J.*, 2, 705, 1983.
92. Kodoma, K., and Yoshizawa., *Sake*, in *Alcoholic Beverages*, Rose, A.H., Ed., Academic Press, London, 1977, 423.
93. Korhola, M., *In Gene Expressions in Yeast*, *Proc. Alko Yeast Symp.*, Helsinki, 1983, 231.
94. Krouwel, P.G., and Braber, L., *Biotechnol. Lett.*, 1, 403, 1979.
95. Kusano T., Steinmetz. D., Hendrickson. W.G., Murchie, J., King. M., Benson. A., Schaechter. M., *J. Bacteriol.*, 158, 313, 1984.
96. Lai, B -T., N.W. Chin, A.E. Stanek, W. Ken, and K.W. Lanks., *Mol. Cell Biol.*, 4 , 2802, 1984.
97. Lembovitz, A.L., and C.W. Slaymen., *J. Bacteriol.*, 108. 1087, 1971.
98. Larue, F., Lafon - Lafourcade, S., and Ribereau - Gayon, F., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 808, 1980.
99. Leano, G. and Van Uden, N., *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 1561, 1982.
100. Lee, J.H., Williamson, D., and Rogers, P. L., *Biotechnol. Lett.*, 2, 141, 1980.
101. Legman, R., and Margalith. P., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 320, 1983.

102. Lin, G.C., and Z. Werb., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3218, 1982.
103. Lin, C.-Y., J.K. Roberts, and J.L. Key., *Plant Physiol.*, 74, 152, 1984.
104. Lindegren, C.C., Lindegren, G., *J. Bacteriol.*, 46, 405, 1943.
105. Lindquist, S., *Dev. Biol.*, 77, 463, 1980.
106. Lindquist, S., *Nature*, 293, 311, 1981.
107. Lindquist, S., B. Didomenico, G. Bugalsky, S. Kurtz, L. Petko, and S. Sonoda., In: M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissières. (ed.), *Heat shock, from bacteria to man*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1982, 167.
108. Loomis, W.F., and S.A. Wheeler., *Dev. Biol.*, 90, 412, 1982.
109. López - Calderón. I., Gardá - Olmedo. E., *Mutat. Res.* 108, 133, 1983.
110. Loureiro, V. and Ferreira, H.G., *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2263, 1983.
111. McAlister, L., S. Strausberg, A. Kulaga, and D.B. Finkelstein., *Curr. Genet.*, 1, 63, 1979.
112. McAlister, L., and D.B. Finkelstein., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, 819, 1980.
113. McAlister, L., and D.B. Finkelstein., *J. Bacteriol.*, 143, 603, 1980.
114. Michée - Hamzehpour, M., P. Grange, T.C. Ton - That, and G. Turian., *Arch. Microbiol.*, 125, 53, 1980.
115. Mitchell, H.K., G. Moller, M.S. Petersen, and L. Lipps-Sarmiento., *Dev. Genet.*, 1, 181, 1979.
116. Mortimer, R.K., and Schild. D., *Microbiol. Rev.*, 44, 519, 1980.
117. Moulin, G., Boze, H., and Galzy, P., *Biotechnol. Lett.*, 3, 351, 1981.

118. Moulin, G., Boze, H., and Galzy, P., *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2357, 1980.
119. Nagley, P., Linnene, A.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 585, 1978.
120. Nagodawithana, T.W., Castellano, G., and Steinkraus, K. H., *Appl. Microbiol.*, 28, 383, 1974.
121. Nagodawithana, T.W. and Steinkraus, K.H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 158, 1976.
122. Nagodawithana, T.W., Castellano, G. and Steinkraus, K.H., *Appl. Microbiol.*, 28, 383, 1974.
123. Navarro, J.M. and Durand, G., *Ann. Microbiol.*, 129, 215, 1978.
124. Ohta, K. and Hayashida, S., *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 821, 1983.
125. Ohta, K., Supanwong, K., and Hayashida, S., *J. Bacteriol.*, 59, 435, 1981.
126. Oshima, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 1093, 1975.
127. Panchal, C.J. and Stewart, G.G., *Dev. Ind. Microbiol.*, 22, 711, 1980.
128. Panchal, C.J. and Stewart, G.G., in *Current Developments in Yeast Research*, Pergamon Press, Oxford, 1981, 9.
129. Panchal, C.J., Peacock, L., and Stewart, G. G., *Biotechnol. Lett.*, 4, 639, 1982.
130. Panchal, C.J. and Stewart, G.G., *J. Inst. Brew.*, 86, 207, 1980.
131. Palham, H.R.B., *EMBO J.*, 3, 3095, 1984.
132. Perutz, M.F., et Reidt, H., *Nature*, 255, 256, 1975.
133. Petersen, U.S., and H.K. Mitchell., *Proc Natl. Acad. Sci. US.A.*, 78, 1708, 1981.
134. Plesset, J., Palm, C., and McLaughlin, C. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 1340, 1982.

135. Pierce, G.B., Litchfield, J.H., and Lipinsky, E.S., *Dev. Ind. Microbiol.*, 22, 703, 1980.
136. Pontefract, R.D., Miller, J.J., *J. Microbiol.*, 8, 573, 1962.
137. Porter, L. J. and Ough, C.S., *Am. J. Enol. Vitic.*, 33, 222, 1962.
138. Ranganathan, B. and Baht, J.V., *J. Indian. Inst. Sci.*, 40, 105, 1958.
139. Russell, I., and G.G. Stewart., *J. Inst. Brew. London*, 85, 95, 1979.
140. Russell, I., and G.G. Stewart., *J. Inst. Brew. London*, 86, 55, 1980.
141. Ryu, Y.W. and Kwon, J.J., *Korean J. Microbiol.*, 20, 67, 1982.
142. Sa - Correia, I. and Van Uden, N., *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1665, 1983.
143. Sa - Correia, I. and Van Uden, N., *Biotechnol. Lett.*, 4, 805, 1982.
144. Saigal, D. and Viswanathan, L., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 6, 78, 1984.
145. Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Uedono, S., Kumnuanta, J., and Taguchi, H., *Biotechnol. Lett.*, 5, 351, 1983.
146. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1983.
147. Simoes - Mendes, B., Madeira - Lopes, A., and Van Uden, N., *Z. Allg. Mikrobiol.*, 18, 275, 1978.
148. Spradling A., M.L. Pardue, and S. Penman., *J. Mol. Biol.*, 109, 559, 1977.
149. Steinkraus, K.H., Cullen, R.E., Farekh, L.J., and Jelen, V., In *Bioconversion and Biochemical Engineering*, Vol. 2, Ghosh, T., Ed., Pragnada Kapur, New Delhi, 1981.

150. Stetter, K.O. et al., Syst. Appl. Microbiol., 4, 535, 1983.
151. Stewart, G.G., Can. J. Microbiol., 27, 973, 1981.
152. Stewart G.G., Russell, I. and C. Panchal., In Current developments in yeast research. Edited by G.G. Stewart and I. Russell, Pergamon Press, Toronto. 1981, 17.
153. Stewart, G.G., and I. Russell., Eur. Brew. Conv. Proc. 17<sup>th</sup> Congr. 1979, 475.
154. Strehalano, P. and Goma, G., Am. J. Enol. Vitic., 34, 1, 1983.
155. Sugden, P.A. and Oliver, S.G., Biotechnol. Lett., 5, 419, 1983.
156. Sarkow, L., Fellers, C.R., and Levine, A.S., J. Bacteriol., 44, 367, 1944.
157. Taylor, N.W., J. Bacteriol., 88, 929, 1964.
158. UNIDO Genetic Engineering and Biotechnology Monitor. Issue No. 23, 41, 1988.
159. UNIDO Genetic Engineering and Biotechnology Monitor. Issue No. 26, 48, 1988.
160. Van Uden, N. and Cruz Duarte, H., Z. Allg. Mikrobiol., 21, 743, 1981.
161. Van Uden, N., CRC Crit. Rev. Biotechnol., 1, 263, 1984.
162. Van Uden, N., Adv. Microbiol. Physiol., 25, 195, 1984.
163. Velazquez, J.M., and S. Lindquist., Cell 36, 655, 1984.
164. Velazquez, J.M., B.J. DiDomenico, and S. Lindquist., Cell 20, 679, 1980.
165. Watson, K. and Cavicchioli, R., Biotechnol. Lett., 5, 683, 1983.
166. Welch, W.J., and J.R. Feramisoo., J. Biol. Chem., 259, 4501, 1984.
167. White, P.H., In Proc. 15<sup>th</sup> Conv. Inst. Brew. (Aust. and N.Z. Sect.), Walter, L.S., Ed., Institute of Brewing, Sydney, 1978, 133.

168. White, R.H., *Nature*, 310, 430, 1984.
  169. Winge, O., Roberts, C., *Compt. rend trav. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, 25, 285, 1954.
  170. Yamagori, T., and T. Yura., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 860, 1982.
  171. Yamagori, T., K. Ito, Y. Nakamura, and T. Yura., *J. Bacteriol.* 134, 1133, 1978.
  172. Yanagishima, N., *Planta.*, 87, 110, 1969.
  173. Zakharov, I.A. and Bandas, E.L., *Sov. Genet.*, 15, 620, 1979.
  174. Zemanoczy, M., Faugeron - Fonty, G., Bernardi, G., *Gene* 21, 193, 1983.
  175. Ziffer, J., *Biotechnol. Lett.*, 5, 805, 1983.
  176. Ziffer, J. and Iosif, M.O., *Biotechnol. Lett.*, 4, 809, 1982.
-

**BÁO CÁO KHÓA HỌC TÓM TẮT**

**NGHIÊN THU ĐỀ TẠI 52D-01-10**

**'TẠO CÁC GIỐNG HẠM MÈN MỠI BẢNG PHƯƠNG PHÁP  
DI TRUYỀN HỌC ĐỂ PHỤC VỤ SẢN XUẤT VÀ NCKH'**

BAO CAO KHOA HOC TOM TAT  
NGHIEM THU DE TAI 52D-01-10  
'TAO CAC GIONG NAM MEN MOI BANG PHUONG PHAP  
DI TRUYEN HOC DE PHUC VU SAN XUAT VA NCKH'

Nấm men *S. cerevisiae* là đối tượng vừa cổ điển vừa hiện đại của CNSH. Nấm men đã được sử dụng để làm nở bột mì và làm cồn từ cách đây 6000 năm /33/. Tuy nhiên, cho đến nay các sản phẩm bắt nguồn từ nấm men vẫn chiếm khoảng 70 o/o tổng số các sản phẩm CNSH quốc tế. Tỷ lệ này trong tương lai còn có thể tăng lên nữa do việc đưa các gen của động vật, thực vật, vi sinh vật vào nấm men và sử dụng chúng để sản xuất các sản phẩm mới vốn không đặc thù cho nấm men.

Đề tài 52D-01-10 nhằm các mục tiêu như đã nêu ở cuối trang I. Toàn bộ kết quả nghiên cứu của đề tài có thể chia thành ba phần chính :

- Chọn giống nấm men *S. cerevisiae* trên cơ sở các nguyên lý di truyền học.
- Di truyền học phân tử nấm men.
- Mô hình di truyền học.

Chương trình nghiên cứu của đề tài được minh họa trên sơ đồ (tr. V). Trên sơ đồ này chương trình nghiên cứu bắt đầu từ khâu thu thập giống chủng (A) đến khâu phân tích di truyền học (B), gây đột biến (C), tạo vật liệu khởi đầu (D), tạo các nòi lai bằng dấu chuẩn (E), tạo các nòi lai bằng vi thao tác (F,G), nghiên cứu sinh lý và quá trình công nghệ (H,I), sản xuất (K). Còn khâu L là tạo ra các mô hình di truyền học để phục vụ các NCKH khác.

**A. CHON GIONG NAM MEN S. CERREVISIAE TREN CO SO CAC NGUYEN LY DI TRUYEN HOC :**

Nguyên lý khoa học cơ bản được sử dụng ở phần này là điều khiển và sử dụng chu trình sống của nấm men *S.cerevisiae* (x.tr. 4). Sau mỗi chu trình số tổ hợp nhiễm sắc thể mới được tạo ra là  $2^{17} - 131.072$ , chưa kể số tổ hợp do trao đổi chéo và do các nhân tố di truyền ngoài nhân. Điều đó thường xuyên tạo ra độ biến dị tổ hợp rất lớn. Ngoài ra, sử dụng chu trình sống của nấm men có thể tiến hành phân tích bộ bốn để xác định vị trí của các gen mà ta quan tâm, lập được bản đồ di truyền. Sử dụng chu trình

sống của nấm men còn có thể hoạch định và tiến hành các sơ đồ lai theo ý muốn.

22 nòi nấm men đang sử dụng trong nước, nhập nội và mới phân lập đã được đưa vào nghiên cứu với những đặc điểm kinh tế và sinh học xác định (bảng 1). Ngoài các đặc điểm kinh tế bình thường cần thiết đối với các nòi sản xuất, các đặc điểm kinh tế chủ yếu được nghiên cứu là khả năng tích lũy sinh khối, tính chịu nhiệt ( $42^{\circ}\text{C}$ ), tính chịu cồn (14 o/o), tính chịu axit (pH = 2) và các tính trạng liên quan khác (x. trang VI).

Bảng 2 là một thí dụ về nghiên cứu đặc điểm di truyền của các tính trạng chống chịu, tích lũy sinh khối và khả năng sinh bào tử của nòi đang dùng trong sản xuất (220) và nòi mới phân lập (TH-4). Trên bảng này tỷ lệ phân ly của các bào tử cho thấy rõ sự kiểm soát của các gen trong nhân đối với các tính trạng nêu trên và có thể kết luận về tính dị hợp tử của các nòi nói trên đối với các tính trạng đó.

Bảng 3, 4 cho thấy các gen quy định tính chịu cồn (ALC), tích lũy sinh khối (BIO) và sinh bào tử (HO) nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau và tỷ lệ giữa các kiểu bộ bốn không sai khác với 1 : 1 : 4 .

Để có thể tiến hành các phép lai hàng loạt, chúng tôi đã tạo ra các đột biến nhân và đột biến tế bào chất để làm gen đánh dấu (dấu chuẩn di truyền). Kết quả gây đột biến nêu lên ở bảng 5.

Sơ đồ lai (hình 1) đã được thực hiện trên cơ sở các nòi cha mẹ đã có dấu chuẩn di truyền, một phần do tạo ra trong các thí nghiệm ở trên, một phần nhận được từ sưu tập giống của Mortimer. Nhờ tạo ra được hàng loạt nòi lai chúng tôi đã tiến hành phân tích bộ bốn đối với các tính trạng nghiên cứu. Bảng 6 là một minh họa về phân tích di truyền đối với một số các nòi lai nói trên. Tỷ lệ phân ly của các tính trạng cho phép kết luận về mức bội thể của các nòi lai và các nòi cha mẹ là lệch bội hoặc đa bội.

Đối với những nòi lai sinh bào tử thấp chúng tôi đã sử dụng phương pháp nghiên cứu nhóm chọn ngẫu nhiên của các bào tử (bảng 7). Tỷ lệ phân ly ở đây cũng phù hợp với kết quả phân tích bộ bốn thu được trong thí nghiệm trên.

Bảng 1. Một số tính trạng chống chịu và các đặc tính kinh tế của các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm :

Số TT	Nòi	Đổi chủng	42°C	14% cồn	pH=2	60% glucoza	28°Brix ri đường	Sinh khối (g/l)	Lên men (cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> /10giờ)
1	MG-58	+++	-	-	-	-	-	9,4±1,3	7,3±0,8
2	MG-80	++	-	-	-	-	-	6,7±0,8	2,7±0,4
3	MG-81	++	-	-	-	-	-	6,9±0,7	3,1±0,5
4	MG-95	+++	-	-	-	-	-	9,8±0,9	4,5 ±0,9
5	MG-82	++	-	-	-	-	-	5,6±0,8	1,7±0,3
6	MG-84	++	-	-	-	-	-	6,1±0,7	2,1±0,6
7	MG-85	+++	-	-	-	-	-	11,6±0,7	6,2±0,7
8	MG-89	++	-	-	-	-	-	8,4±0,8	1,3±0,4
9	MG-93	+++	-	-	-	-	-	10,7±0,8	5,2±0,8
10	MG-97	+++	-	-	-	-	-	10,5±0,8	2,8±0,6
11	MG-98	+++	-	-	-	-	-	10,1±0,9	0,9±0,2
12	TH-30	+++	++	+	+	+	+	25,1±1,3	13,4±1,2
13	TH-4	+++	++	+	+	+	+	28,5±1,1	15,7±1,4
14	DN	+++	++	+	+	+	++	36,2±1,1	16,2±1,1
15	TP	+++	-	+	+	+	+	32,7±0,9	14,4±0,9
16	220	+++	++	+	+	+	+	35,6±1,3	14,5±0,9
17	HCM	+++	+	+	-	+	+	33,7±0,9	13,6±1,7
18	TM	+++	-	-	-	+	+	37,2±0,8	12,5±0,8
19	S1	+++	-	-	-	+	+	36,2±0,9	9,7±1,2
20	A-18	+++	-	-	-	+	+	35,8±1,5	10,5±0,9
21	F	+++	+	+	+	+	++	33,6±0,8	13,6±0,7
22	H.44	+++	-	+	+	+	+	35,7±0,8	14,3±0,9

Chú thích:    +++ : mức rất tốt  
                   + : mức

                  ++ : mức tốt  
                   - : không mức

**Bảng 2** : Sự phân ly về các tính trạng chống chịu, khả năng tích lũy sinh khối, khả năng sinh bào tử ở 2 nồi TH-4 và 220

Môi trường và điều kiện	Nồi	Kiểu phân ly				
		0 <sup>+</sup> :4 <sup>-</sup>	1 <sup>+</sup> :3 <sup>-</sup>	2 <sup>+</sup> :2 <sup>-</sup>	3 <sup>+</sup> :1 <sup>-</sup>	4 <sup>+</sup> :0 <sup>-</sup>
42°C	Nồi TH-4					
	Số nang	3	6	19	7	5
	Tỷ lệ %	7,5	15,0	47,5	17,5	12,5
	Nồi 220					
	Số nang	0	13	21	11	0
	Tỷ lệ %	0	28,9	46,7	24,0	0
14% ođn	Nồi TH-4					
	Số nang	0	1	33	3	0
	Tỷ lệ %	0	2,7	89,2	8,1	0
	Nồi 220					
	Số nang	0	19	22	7	0
	Tỷ lệ %	0	39,6	45,8	14,6	0
pH=2	Nồi TH-4					
	Số nang	0	10	14	9	4
	Tỷ lệ %	0	27,0	37,8	24,3	10,8
Tích lũy sinh khối (g/l)	Nồi TH-4					
	Số nang	0	3	36	0	1
	Tỷ lệ %	0	7,5	90,0	0	2,5
	Nồi 220					
	Số nang	2	0	41	2	0
	Tỷ lệ %	4,4	0	91,1	4,4	0
Sinh bào tử	Nồi TH-4					
	Số nang	0	1	35	0	0
	Tỷ lệ %	0	2,8	97,2	0	0
	Nồi 220					
	Số nang	0	0	45	0	0
	Tỷ lệ %	0	0	100	0	0

**Chú thích** : + : mọc được ở 42°C; 14% ođn; pH = 2; có khả năng tích lũy sinh khối lớn gấp ít nhất hai lần - ; có khả năng sinh bào tử . - : không mọc được ở 42°C; 14% ođn; pH=2 ; không sinh bào tử .

**Bảng 3 :** Sự phân ly trong từng trường hợp về 3 dấu hiệu A/c , B/c , H/o ở nòi TH-4 .

Trường hợp và các cặp gen	Các kiểu bộ bốn			$\chi^2$	$P \chi^2_{1:1:4}$
	P	H	T		
Trường hợp thứ nhất					
ALC/a/c - B/C/b/c	3	5	25	1,6	< 0,05
ALC/a/c - H/O/h/o	6	4	23	0,5	< 0,05
B/C/b/c - H/O/h/o	5	7	21	0,5	< 0,05
Trường hợp thứ hai					
ALC/a/c - B/C/b/c	3	5	25	1,6	< 0,05
ALC/a/c - H/O/h/o	4	6	23	0,5	< 0,05
B/C/b/c - H/O/h/o	7	5	21	0,5	< 0,05
Trường hợp thứ ba					
ALC/a/c - B/C/b/c	5	3	25	1,6	< 0,05
ALC/a/c - H/O/h/o	6	4	23	0,5	< 0,05
B/C/b/c - H/O/h/o	7	5	21	0,5	< 0,05
Trường hợp thứ tư					
ALC/a/c - B/C/b/c	5	3	25	1,6	< 0,05
ALC/a/c - H/O/h/o	4	6	23	0,5	< 0,05
B/C/b/c - H/O/h/o	5	7	21	0,5	< 0,05

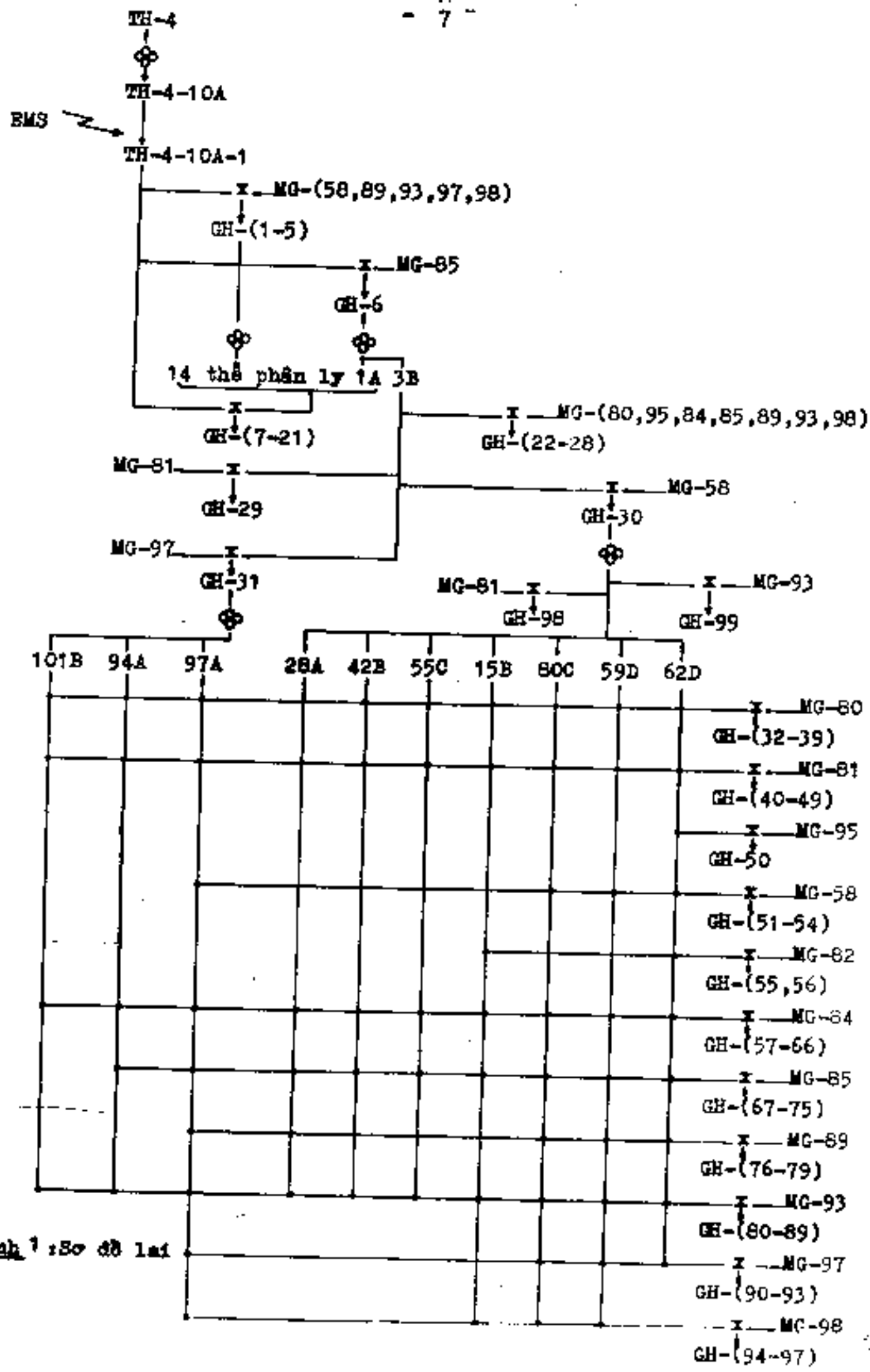
**Bảng 4 :** Sự phân ly trong từng trường hợp về 2 dấu hiệu B/c và H/o ở nòi 220 .

Trường hợp và các cặp gen	Các kiểu bộ bốn			$\chi^2$	$P \chi^2_{1:1:4}$
	P	H	T		
Trường hợp thứ nhất					
B/C/b/c - H/O/h/o	6	7	28	0,12	< 0,05
Trường hợp thứ hai					
B/C/b/c - H/O/h/o	7	6	28	0,12	< 0,05

Biểu 2 : Tác dụng gây đột biến của tia UV, EMS và ethidium bromide ở một số loài nấm men.

Số TT	Nội	Táo nhân	Liều lượng	Độ sống sót (%)	Số khuẩn lạc được kiểm tra	Số đột biến thu được	Tần số đột biến (%)
1	TH-4-10A	UV (+)	10 giây	0,16 ± 0,03	17.500	0	0
2	TH-4-28B	-nt-	9 -nt-	0,25 ± 0,03	11.743	0	0
3	220-6A	-nt-	12 -nt-	0,18 ± 0,04	11.618	0	0
4	220-9B	-nt-	11 -nt-	0,15 ± 0,03	10.884	0	0
5	220-21A	-nt-	10 -nt-	0,20 ± 0,05	9.879	0	0
6	TH-4-10A	EMS (++)	0,3 ml	0,26 ± 0,07	14.547	2	1,37 × 10 <sup>-2</sup>
7	TH-4-28B	-nt-	0,5 ml	0,21 ± 0,05	10.083	0	0
8	220-6A	-nt-	0,4 ml	0,19 ± 0,05	15.636	0	0
9	220-9B	-nt-	0,3 ml	0,32 ± 0,10	13.214	0	0
10	EM	ethidium bromide	10 g/ml				
11	220	-nt-	-nt-		330	318	96,4
12	HCM	-nt-	-nt-		294	280	95,2
13	TM	-nt-	-nt-		444	425	95,7
14	SI	-nt-	-nt-n		360	340	94,4
15	A.1B	-nt-	-nt-		480	465	96,9
16	Y	-nt-	-nt-		420	397	94,2
17	H.44	-nt-	-nt-		321	306	95,3
					321	298	92,8

Chú thích : ( + ) khoảng cách chiếu là 20,5 cm  
 ( ++ ) số ml EMS trong 10 ml dịch .



lưu ý: Sơ đồ này

Bảng 6 : Phân tích bộ bốn ở các nòi lai GH-29 , GH-30 , GH-31 , GH-98 và GH-99 .

Nòi	Tính trạng	Kiểu bộ bốn				
		0 <sup>+</sup> :4 <sup>-</sup>	1 <sup>+</sup> :3 <sup>-</sup>	2 <sup>+</sup> :2 <sup>-</sup>	3 <sup>+</sup> :1 <sup>-</sup>	4 <sup>+</sup> :0 <sup>-</sup>
GH-29	The	4	10	9	5	3
	Alc	5	6	20	2	0
	Acı	0	1	12	10	12
	Bio	1	3	21	5	4
	Spo	4	0	5	6	15
	Met	0	0	2	14	16
	Tyr	0	0	1	8	23
	Lys	0	2	9	14	7
	Ura	0	0	11	10	11
	Adc	0	7	19	5	1
	GH-30	The	0	2	5	13
Alc		0	3	7	15	15
Acı		0	0	4	6	22
Bio		0	1	1	4	24
Spo		0	3	1	15	12
Met		0	2	4	19	18
Leu		0	2	10	13	19
His		0	1	3	25	14
GH-31	The	0	4	27	12	6
	Alc	6	4	6	26	14
	Acı	12	12	19	16	7
	Bio	1	8	13	12	6
	Spo	0	3	6	12	9
	Met	0	2	6	19	30
	Adc	3	3	21	25	15
	Leu	3	7	38	17	2
	Trp	1	4	14	26	22
	Ura	1	3	13	34	16
	Arg	0	2	12	33	20
	His	3	7	26	25	6
	Asp	0	3	14	33	17
	Lys	0	3	11	33	20

Bảng 6 : (tiếp theo)

Hỏi	Tình trạng	Kiểu bộ bốn				
		0 <sup>+</sup> :4 <sup>-</sup>	1 <sup>+</sup> :3 <sup>-</sup>	2 <sup>+</sup> :2 <sup>-</sup>	3 <sup>+</sup> :1 <sup>-</sup>	4 <sup>+</sup> :0 <sup>-</sup>
GH-98	The	2	6	2	2	0
	Alc	0	0	3	6	3
	AcI	1	0	5	2	4
	Bio	0	0	9	2	0
	Spo	0	0	5	2	4
	Met	0	4	4	3	0
	Tyr	0	2	1	4	4
	Ura	0	0	3	5	3
	Ade	0	2	6	3	0
	Lys	0	1	4	3	3
	Leu	0	0	2	5	4
	His	0	0	1	5	5
	GH-99	The	0	4	3	4
Alc		0	3	5	5	3
AcI		1	1	4	6	4
Bio		0	2	14	0	0
Spo		0	0	6	5	5
Leu		0	2	3	5	6
Ade		0	0	11	4	2
Lys		0	4	4	6	2
Met		0	3	6	1	6
Aro		1	7	3	2	3
His		0	1	9	6	0
Ura		3	0	8	2	3

Chú thích : + và - : mọt và không mọt trên môi trường phân tích tương ứng với từng tình trạng .

**Bảng 7.** : Phân tích nhóm chọn ngẫu nhiên của các bào tử ở các nòi lai GH-3 , GH-5, GH-23 và GH-24 .

Nòi	Tình trạng	Tỷ số phân ly		Nòi	Tình trạng	Tỷ số phân ly	
		+	-			+	-
GH-3	The	41	19	GH-23	The	30	12
	Alc	20	40		Alc	24	16
	Ac1	53	7		Ac1	37	5
	Bio	47	13		Bio	11	31
	Ade	40	20		Ade	34	8
	Lys	42	18		Lys	34	8
	His	41	19		His	29	13
	Aro	54	6		Aro	37	5
	Met	48	12		Met	32	10
			Leu		38	4	
			Ily		29	13	
			Ura	31	11		
GH-5	The	34	23	GH-24	The	6	52
	Alc	38	19		Alc	42	16
	Ac1	18	39		Ac1	17	41
	Bio	20	37		Bio	20	38
	Ade	43	14		Ade	47	11
	Leu	40	17		Leu	46	12
	Trp	47	10		Trp	50	8
	His	38	19		His	39	19
	Met	41	16		Met	54	4
	Asp	39	18		Arg	42	16
	Ura	39	18		Thr	41	17

**Chú thích :** + và - (xem bảng 6)

Dựa trên các kết quả phân tích di truyền học và nhờ tạo ra được trong quá trình phân tích đó những nòi vừa mang dấu chuẩn di truyền, vừa mang các tính trạng chống chịu và tính trạng kinh tế, chúng tôi đã lựa chọn các nòi cha mẹ và tiến hành các phép lai theo sơ đồ (hình 2) để tạo ra các nòi lai có ý nghĩa kinh tế.

Các nòi lai có triển vọng ứng dụng vào sản xuất đã được đưa vào nghiên cứu so sánh với các nòi đang dùng trong sản xuất. Bảng 8 cho thấy một số nòi lai mới tạo ra như GH-2, GH-3, GH-44 có một vài hoặc tất cả các chỉ tiêu kinh tế vượt các nòi đang dùng trong sản xuất (các nòi TM, 220, và MN).

Trên đồ thị (hình 3) nòi lai GH-153 có ưu điểm là ở nhiệt độ 38°C cho sinh khối trội hơn nòi TM và trên hình 4 nòi lai GH-191 tạo cồn nhiều hơn ở giai đoạn đầu của quá trình lên men so với nòi DN là nòi sản xuất cồn tốt nhất hiện nay ở nước ta. Ưu điểm này tránh cho môi trường khỏi bị nhiễm trong giai đoạn đầu lên men.

Một số nòi lai có tính ưu việt nói trên đã được nghiên cứu về mặt sinh lý, tối ưu hóa môi trường và đưa vào sản xuất ở các qui mô khác nhau (x. mục B trang II - III và phụ lục trang 101).

Nội dung chi tiết phần A trình bày ở các trang 39 - 74.

## B. DI TRUYỀN HỌC PHÂN TỬ NAM MEN :

Phần nghiên cứu này gồm 2 loại thí nghiệm :

1. Sử dụng trực tiếp các plasmid 'con thoi' pJDB 207 và pYE(CEN3)41 (hình 5) có khả năng biến nạp và biểu hiện trong *E. coli* và cả trong *S. cerevisiae*. Sau khi các plasmid bị chiếu UV ở các liều lượng khác nhau chúng được đưa vào các tế bào *E. coli* và *S. cerevisiae* thuộc hai loại nòi khác nhau : kiểu dại (dạng bình thường) và dạng bị mất khả năng sửa chữa ADN. Kết quả được trình bày trên các đồ thị (hình 5). Đối với *E. coli*, nòi kiểu dại MH1 đã phục hồi rất tốt các sai hỏng của ADN do UV gây ra, còn các nòi bị mất khả năng sửa chữa ADN (158 và 172) không phục hồi được. Đối với *S. cerevisiae*, nòi kiểu dại RAD phục hồi tốt. Tuy nhiên nòi đột biến rad 3-1, mặc dù không có khả năng sửa chữa các sai hỏng trong ADN nhân của chính nó, thì lại có thể phục hồi các sai hỏng như thế trong ADN plasmid.

Để nghiên cứu cơ chế sửa chữa ADN, chúng tôi đã tiến hành 21 thí nghiệm xử lý và không xử lý ánh sáng xanh đối với plasmid

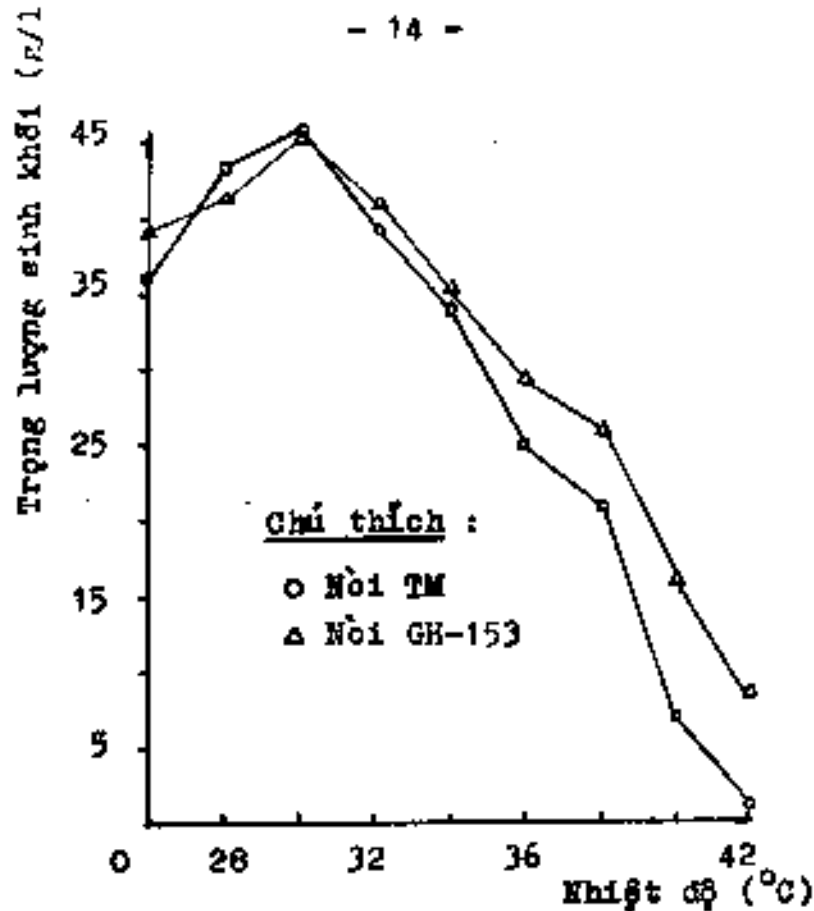


Bảng 8 : So sánh các nòi lai với các nòi sản xuất

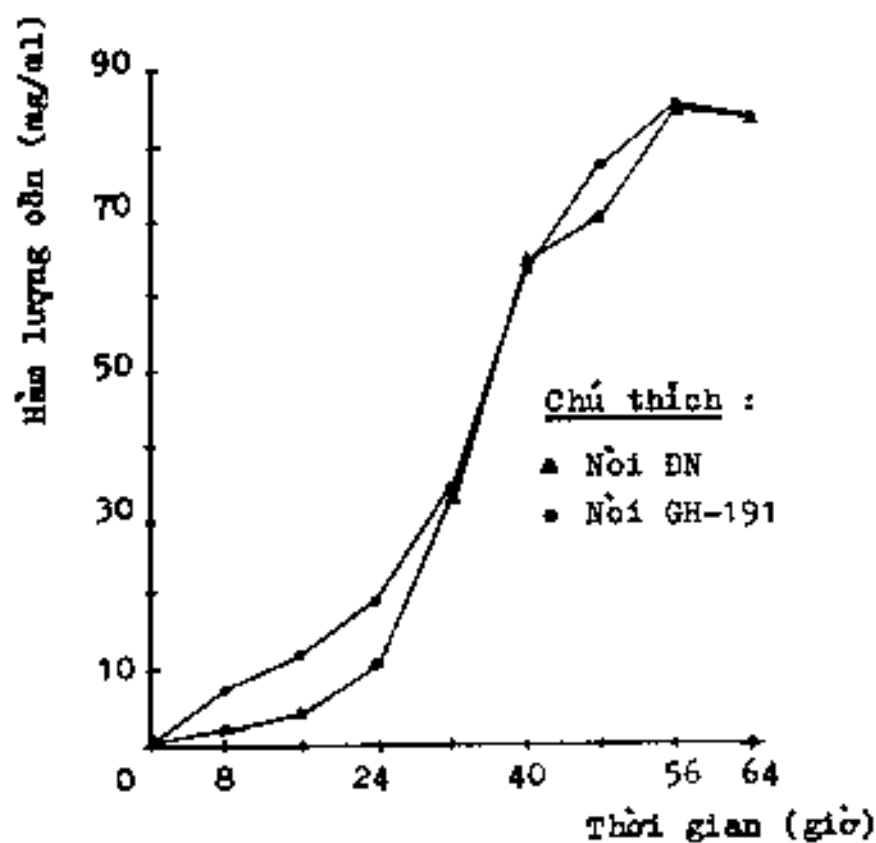
Số TT	Nòi	Sinh khối (OD)	Lên men đường	
			sacaroza (cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> /6h)	maltoza (cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> /6h)
1	TM	0,31 ± 0,02	5,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3
2	220	0,33 ± 0,03	6,0 ± 0,5	0
3	MN	0,30 ± 0,03	5,5 ± 0,5	4,0 ± 0,4
4	GH-2	0,25 ± 0,02	8,5 ± 0,3	2,0 ± 0,2
5	GH-3	0,25 ± 0,02	6,5 ± 0,6	0,5 ± 0,04
6	GH-43	0,31 ± 0,03	5,5 ± 0,5	0
7	GH-44	0,35 ± 0,03	6,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3
8	GH-45	0,26 ± 0,02	5,0 ± 0,3	3,5 ± 0,3
9	GH-49	0,28 ± 0,02	6,5 ± 0,6	4,0 ± 0,4
10	GH-50	0,30 ± 0,02	4,0 ± 0,3	3,5 ± 0,3
11	GH-51	0,26 ± 0,03	4,0 ± 0,4	3,5 ± 0,3
12	GH-52	0,31 ± 0,03	3,0 ± 0,2	0
13	GH-53	0,33 ± 0,03	4,0 ± 0,3	0

Bảng 9 : Các nòi nấm men dùng trong thí nghiệm mô hình di truyền học

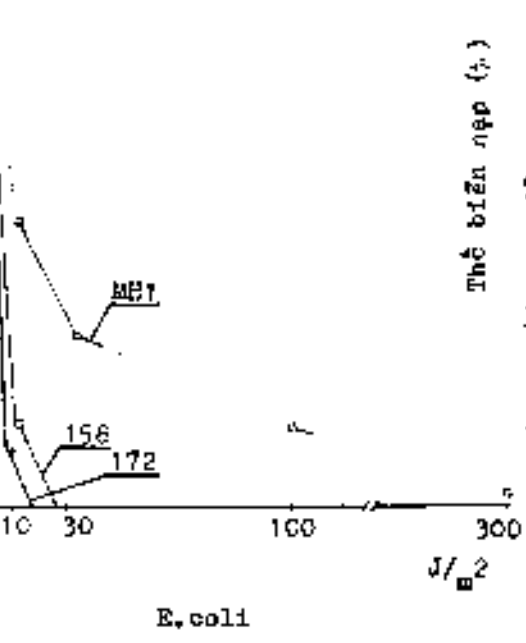
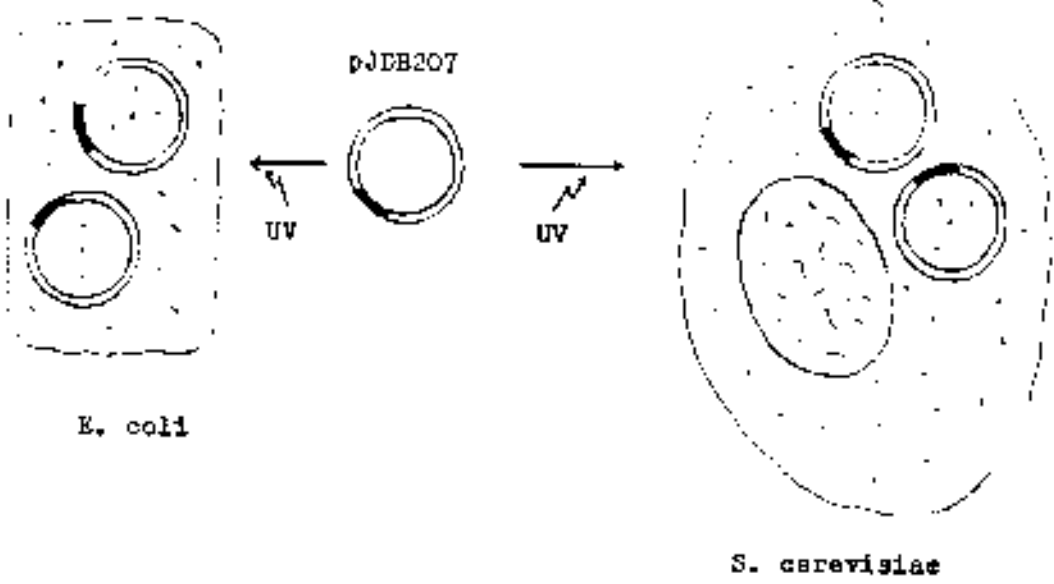
Nòi	Genotyp
MG-79	a his7 tyr1 cdc9 aro1B hom2 <u>rad2</u> <sup>VII</sup> thr1 gal2 ade2 lys11
MG-81	α cdc19 tyr1 lys2 gal1 trp1 <u>rad4</u> <sup>V</sup> met14 ura1 gal2 lys9 pet8 ade2 gal5
MG-82	a <u>rad18</u> <sup>III</sup> lys4 trp1 prt3 CUP <sup>r</sup> gal2 ade2 met2 pha2
MG-93	a ade1 gal1 lys5 aro2 his6 ura2 gal2 lys7 prt1 <u>rad1</u> <sup>XVI</sup> met14
MG-95	α gal1 leu2 his2 lys1 his6 ilv3 ura1 met14 cly7 gal2 pet 8 ade2 <u>rad2</u> <sup>VII</sup>



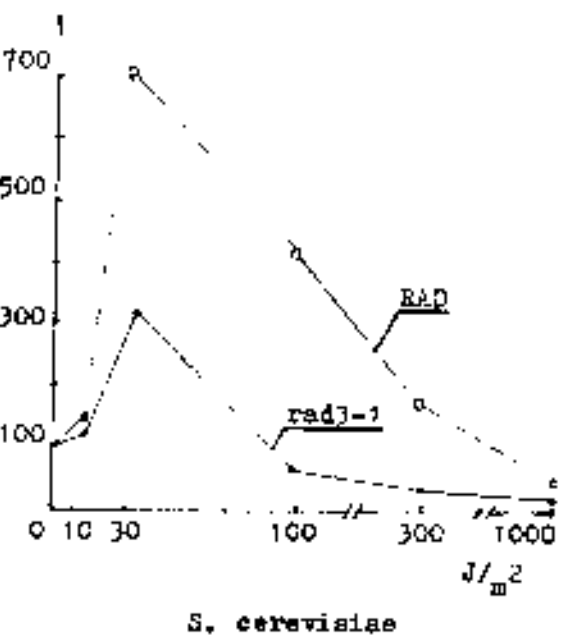
Hình 3 : Sinh khối của các nồi nấ men khí nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau.



Hình 4 : Sự lên men cồn của các nồi nấ men



E. coli



S. cerevisiae

**Hình 5:** Sự hình thành các thế biến nạp với plasmid đã chiếu UV.

sau khi chiếu UV, trước khi biến nạp chúng vào các tế bào *S. cerevisiae*. Kết quả cho thấy hiệu quả sửa chữa ADN trong cả 2 lô nói trên là giống nhau (xem chi tiết tr. 78). Điều đó chứng tỏ sự sửa chữa ADN ở đây đã xảy ra không phải do phản ứng quang phục hoạt (photoreactivation) mà là theo cơ chế cắt bỏ (excision):

2. Các gen sửa chữa UVRA và UVRB của vi khuẩn đã được tách dòng (hình 6). Các vùng promotor của chúng được cắt bỏ bằng enzym và được thay thế bởi promotor của gen cytochrome c lấy từ nấm men. Các gen lai này được xen vào plasmid 'con thoi' nấm men - vi khuẩn pJDB 207 dẫn đến sự hình thành các plasmid pJL3 và pJL4. Sau khi nhân lên trong *E. coli* và làm sạch, các plasmid này được đưa vào các nòi nấm men bị khuyết tật cơ chế sửa chữa. Dùng các phương pháp miễn dịch học và enzym học có thể phát hiện được hoạt động chức năng của UVRA và UVRB. Tuy nhiên không thấy có hiện tượng bổ trợ nào giữa các sai hỏng về sửa chữa chúng tỏ có sự phân hướng trong quá trình tiến hóa của hai hệ thống sửa chữa của *E. coli* và *S. cerevisiae*.

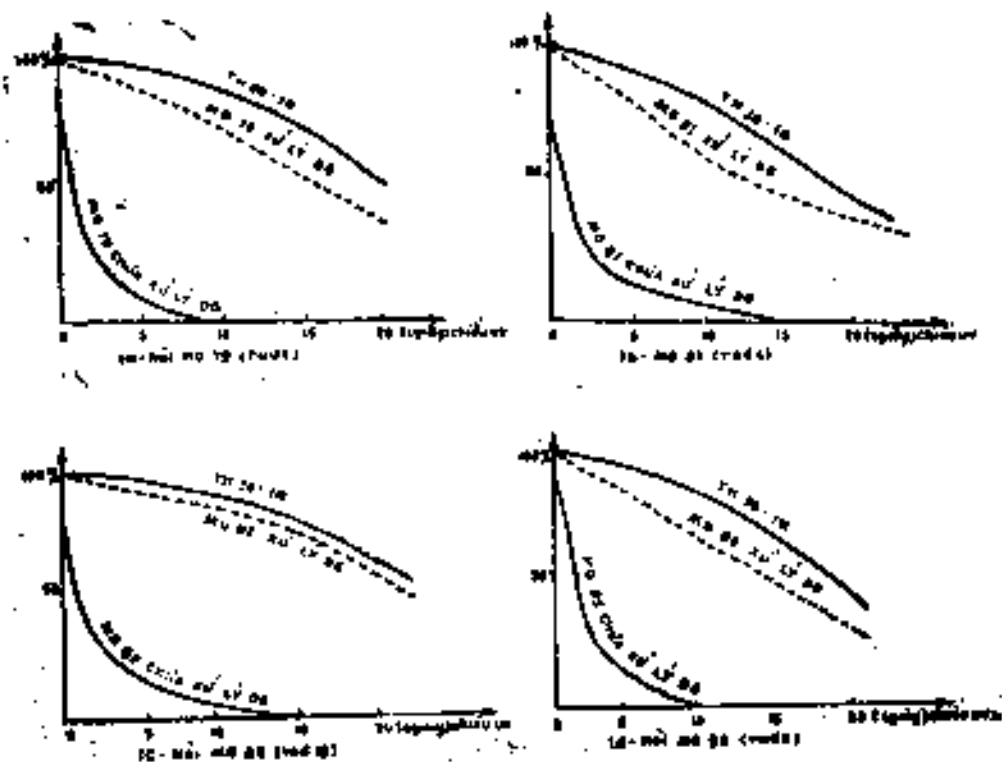
Xem chi tiết phần B ở các trang 75 - 79.

### C. MÔ HÌNH DI TRUYỀN HỌC :

Năm nòi nấm men *S. cerevisiae* có genotyp xác định (bảng 9) nhận được từ sưu tập giống của Mortimer (Mỹ) đã được lựa chọn, phân lập lại và sử dụng như một mô hình nghiên cứu. Đặc điểm của tất cả các nòi này là đều mang đột biến mất cảm cảm với tia UV (các đột biến có ký hiệu rad), chỉ một liều lượng nhỏ các tia nói trên cũng đủ làm chết toàn bộ hoặc một phần lớn các tế bào của chúng. Trong khi các nòi kiểu đại bị ảnh hưởng không đáng kể. Các nòi này sau khi bị chiếu UV được chia làm 2 lô : xử lý và không xử lý đầu gốc. Sau đó cấy chúng lên môi trường đủ bình thường và đếm số khuẩn lạc mọc lên.

Các kết quả nhận được (xem các đồ thị trên hình 7) cho thấy sau khi xử lý đầu gốc, tất cả các nòi đã trở thành không mất cảm với tia UV, gần giống với nòi kiểu đại, và hiệu quả này được giữ lại qua hàng trăm thế hệ sinh sản của tế bào. Trong khi ở lô không xử lý đầu gốc thì tính mất cảm với UV vốn có của các nòi vẫn thể hiện như trước.

Xem chi tiết phần C ở các trang 80 - 85 .



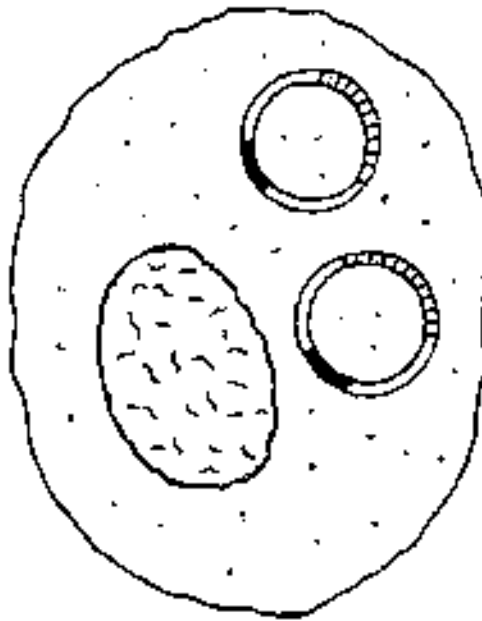
**Hình 7 :** Đồ thị biểu diễn khả năng sống sót sau khi chiếu UV của các nòi nấm men đã xử lý đầu gốc qua 5 lần cấy truyền liên tiếp.

D. Trong thời gian thực hiện, đề tài đã đào tạo được 1 phó tiến sỹ, 3 thực tập sinh sau đại học, 2 sinh viên và tổ chức được 2 lớp CÔNG NGHỆ SINH HỌC với sự tham gia của các chuyên gia trong và ngoài nước.

pJDB207



pJL3



Hình 6 : Sơ đồ tách, gắn và đưa các gen UVR  
từ vi khuẩn sang nấm men.