



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033918

(51)⁸ C12C 3/12; C12H 1/16

(13) B

(21) 1-2018-03898

(22) 03/02/2017

(86) PCT/EP2017/052446 03/02/2017

(87) WO2017/134260 10/08/2017

(30) 16154513.2 05/02/2016 EP

(45) 25/11/2022 416

(43) 26/11/2018 368A

(73) HEINEKEN SUPPLY CHAIN B.V. (NL)

Burgemeester Smeetsweg 1, 2382 PH Zoeterwoude, The Netherlands

(72) BROUWER, Eric Richard (NL); DEKONINCK, Tinne (BE); VANBENEDEN, Nele (BE); VAN VEEN, Marcel (NL); SCHOUTEN, Maria Elizabeth Wilhelmina (NL).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHIẾT PHẨM HUBLÔNG BỀN VỚI ÁNH SÁNG, CHIẾT PHẨM HUBLÔNG BỀN VỚI ÁNH SÁNG VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT BIA

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chiết phẩm hublông bền với ánh sáng, phương pháp này bao gồm: tạo chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước chứa các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 10% theo khối lượng chất khô và chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, tùy ý sau khi pha loãng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chiết phẩm hublông bền với ánh sáng và việc ứng dụng các chiết phẩm hublông này trong bia. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế chiết phẩm hublông bền với ánh sáng, phương pháp này bao gồm việc chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các hublông là các hoa cái của cây hublông *Humulus lupulus*. Chúng được sử dụng làm một thành phần trong bia, tạo hương vị đắng, thơm cho bia. Các hublông thường được sấy trong nhà sấy hublông (oast house) trước khi sử dụng các hublông này trong quy trình nấu bia. Trong quy trình nấu bia, dịch nha (chất lỏng giàu đường được tạo ra từ mạch nha) được đun sôi cùng với các hublông trước khi được làm lạnh và được bổ sung thêm nấm men, để bắt đầu quá trình lên men.

Việc đun sôi dịch nha này cùng với các hublông làm chiết xuất các axit alpha (các humulon, chẳng hạn như humulon, adhumulon, cohumulon, posthumulon và prehumulon) vào trong dịch nha ngọt này, các axit alpha này bị đồng phân hóa một phần thành các axit iso-alpha (các isohumulon) tương ứng dưới tác động của nhiệt độ (sự đồng phân hóa bởi nhiệt). Chính các axit iso-alpha này tạo ra vị đắng đặc trưng của bia đã được cho hublông vào. Các mức axit alpha thông thường trong dịch nha tại thời điểm dịch nha này bắt đầu sôi là nhỏ hơn 0,01 % theo khối lượng (dưới 100 ppm). Các nhược điểm của phương pháp cho hublông vào theo cách thông thường này để tạo vị đắng là việc chiết xuất và đồng phân hóa axit alpha không hiệu quả, thường làm cho lượng axit iso-alpha thu hồi được nhỏ hơn 40%.

Có thể cải thiện đáng kể việc sử dụng hublông bằng cách thực hiện quá trình đồng phân hóa axit alpha này bên ngoài quy trình nấu bia này. Về vấn đề này, các sản phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước đã được phát triển. Các sản phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được tạo ra bắt đầu từ chiết phẩm hublông.

Các chiết phẩm hublông thường được thu hồi bằng cách chiết xuất cacbon đioxit lỏng hoặc siêu tới hạn. Các chiết phẩm hublông được thu hồi bằng cách chiết xuất cacbon đioxit chủ yếu tạo ra các axit alpha (các humulon) tiếp đến là các axit beta (các lupulon), và chúng có thể còn được cắt phân đoạn để thu được các chiết phẩm hublông giàu axit alpha.

Từ các chiết phẩm chứa axit alpha này, có thể thực hiện được quá trình đồng phân hóa trước “ngoại tuyến” (“off-line”) các axit alpha bên ngoài quá trình nấu bia (đun sôi dịch nha) bằng cách sử dụng các hợp chất nền kim loại kiềm và/hoặc nền kim loại kiềm thổ bằng hai phương pháp. Phương pháp thứ nhất áp dụng môi trường phản ứng không chứa dung môi, trong khi trong phương pháp thứ hai, quá trình biến đổi được thực hiện sau khi bổ sung thêm các dung môi, hoặc là nước tinh khiết hoặc theo cách khác là nước được trộn với dung môi hữu cơ.

Đã biết đến sự đồng phân hóa axit alpha thành các axit iso-alpha bằng phương pháp quang phân. Ví dụ, đơn đăng ký sáng chế Úc số 7540281 mô tả quy trình làm giàu các hợp chất đắng từ các hublông, và cụ thể hơn làm giàu các axit alpha và beta tinh khiết trong thực tế thu được từ chiết phẩm hublông đã được tinh chế ở mức cao, cụ thể là bằng cách xử lý bằng cacbon đioxit lỏng, khác biệt ở chỗ các axit alpha và/hoặc beta này được quang phân bằng ánh sáng mặt trời, trong quãng thời gian được xác định trước, trong các điều kiện được thích ứng để tạo ra hiệu suất dạng tối ưu trong các điều kiện nhiệt độ thích hợp, ưu tiên gần bằng 60°C, để thu được các axit iso-alpha và các axit deoxy-alpha tương ứng.

Bằng sáng chế Mỹ số 4,767,640 mô tả phương pháp điều chế sản phẩm hublông bền với ánh sáng chủ yếu gồm có các isohumulon đã được khử, và các isohumulon chưa được khử với lượng nhỏ hơn 0,5% và các sản phẩm không bền không phải là các isohumulon. Ví dụ 1 mô tả quy trình trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa được khử, sau đó axit hóa và phân tách thành lớp nước và lớp dầu. Phần chiết chứa dầu thu được như vậy chứa isohumulon đã được khử với lượng là 70%, chất nền với lượng là 6,5% và isohumulon chưa được khử với lượng nhỏ hơn 0,5%. Ví dụ 3 mô tả cách phân chiết chứa dầu này được tinh chế thêm để tạo ra “Pha nước được tinh chế thêm” (Post Purified Aqueous Phase) và “Pha dầu được tinh chế thêm” (Post Purified Oil Phase). Ví dụ 4 mô tả sự phân tách bằng sắc ký phần chiết chứa dầu trong Ví dụ 1 thành ba phần. Ví dụ 5 mô tả thử nghiệm đánh giá độ bền với ánh sáng của các phần

chiết đã được tinh chế nêu trên (“Pha nước được tinh chế thêm” và “Pha dầu được tinh chế thêm”) và của ba phần sắc ký này. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách bổ sung thêm các chất này vào bia và chiếu xạ trong 2 giờ bằng ánh sáng huỳnh quang với cường độ ánh sáng 600 fút-nến (foot-candles - ft-c)(tương đương 12458,4 lux).

Công bố đơn sáng chế quốc tế WO 93/02177 mô tả quy trình sản xuất chất ổn định bọt và tạo vị đắng cho loại đồ uống làm từ mạch nha khác biệt ở chỗ việc chiết xuất các hublông trong các điều kiện thuận lợi cho việc phân tách và thu hồi phân đoạn giàu adprehumulon, và cho đồng phân hóa bằng ánh sáng phân đoạn adprehumulon này để tạo ra iso-adprehumulon.

Đã biết rõ rằng chất lượng hương vị của bia bị ảnh hưởng xấu bởi việc bị phơi sáng, một hiện tượng thường được gọi là hương vị "bị chiếu sáng" ("lightstruck") (nghĩa là, có mùi cà phê tươi do bị oxi hóa bởi ánh sáng) hoặc "bị chiếu nắng" ("sunstruck") (nghĩa là, có mùi cà phê tươi do bị oxi hóa bởi ánh sáng mặt trời), và hiện tượng này là do sự thoái biến của các axit iso-alpha do ánh sáng gây ra.

Cơ chế chính thức tạo ra hương vị "bị chiếu sáng" của bia trong các hệ thống mô hình, bao gồm các isohumulon, riboflavin, và xystein, khi bị phơi ra ánh sáng nhìn thấy được, đã được Kuroiwa và các tác giả đề xuất vào năm 1963. Riboflavin bị kích thích bởi quang hóa gây ra sự phân cắt các isohumulon thành gốc 4-methylpent-3-enoyl, gốc này bị khử cacbonyl thành gốc 3-methylbut-2-enyl. Việc bẫy gốc allyl đã được làm ổn định này bằng gốc thiol được tạo ra từ xystein dẫn đến sự tạo thành 3-methylbut-2-ene-1-thiol (3-MBT), chính hợp chất này tạo ra hương vị "bị chiếu sáng". 3-MBT có mức ngưỡng hương vị cực thấp khoảng 1 ppt hoặc thấp hơn.

Để xảy ra sự tạo thành 3-MBT trong bia bên cạnh các axit iso-alpha, phản ứng này đòi hỏi năng lượng ánh sáng nằm trong dải quang phổ từ 300 nm đến 550 nm, chất nhạy quang (ví dụ, riboflavin, tức là vitamin B2), và nguồn lưu huỳnh (ví dụ, axit amin chứa lưu huỳnh).

Việc xảy ra sự thoái biến quang phân của các axit iso-alpha là do sự hiện diện của mạch bên iso-3-hexenoyl trong các phân tử axit iso-alpha. Bằng cách biến đổi cấu trúc phân tử của các axit iso-alpha này, đặc biệt là bằng cách khử các liên kết C=C và/hoặc C=O trong mạch bên iso-3-hexenoyl, có thể ngăn ngừa đáng kể sự tạo thành 3-MBT trong bia.

Các chất dẫn xuất axit iso-alpha đã được khử có sẵn trên thị trường chứa các axit dihydro-, tetrahydro- và/hoặc hexahydro-iso-alpha, và thường được bổ sung vào sau giai đoạn lên men chính của quá trình nấu bia. Các axit dihydro-iso-alpha này (còn được gọi là các axit rho-iso-alpha) thu được bằng cách khử nhóm cacbonyl trong mạch iso-3-hexenoyl nêu trên thành nhóm hydroxyl, thường là bằng cách sử dụng chất khử là bohđrua kim loại kiềm. Các axit tetrahydro-iso-alpha thu được bằng cách hydro hóa các liên kết C=C trong mạch bên iso-3-hexenoyl nêu trên và mạch bên isopentenyl. Các axit hexahydro-iso-alpha được tạo ra bằng cách kết hợp các quá trình khử và hydro hóa nêu trên.

Có nhu cầu về chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước bên với ánh sáng, tức là về cơ bản không góp phần tạo thành 3-MBT trong bia bị phơi sáng, nhưng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này không bị khử/hydro hóa về mặt hóa học.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện rằng có thể cải thiện đáng kể độ bền với ánh sáng của các chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước bằng cách chiếu sáng các chiết phẩm hublông này bằng ánh sáng mặt trời. Mặc dù các tác giả sáng chế không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, các tác giả tin rằng nhờ sự chiếu sáng này mà các axit iso-alpha này bị thoái biến giống với kiểu thoái biến do quang phân, được coi là nguyên nhân tạo thành 3-MBT trong bia. Tuy nhiên, khi không có mặt các chất phản ứng quan trọng (chẳng hạn như các hợp chất chứa thiol), các sản phẩm thoái biến trung gian hoạt động được tạo ra trong quá trình chiếu sáng đáng lẽ sẽ tham gia vào việc tạo thành 3-MBT, được chuyển hóa thành các sản phẩm phản ứng khác không ảnh hưởng bất lợi đến hương vị hoặc độ bền hương vị của bia.

Theo sáng chế, việc chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này cải thiện đáng kể độ bền với ánh sáng của chiết phẩm hublông này, nhưng bất ngờ là không có nhiều ảnh hưởng ngoài tác động hạn chế đến vị đắng và các đặc trưng hương vị mong muốn của chiết phẩm hublông này.

Do đó, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chiết phẩm hublông bền với ánh sáng, phương pháp này bao gồm:

- tạo chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước có chứa các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 10% theo khối lượng chất khô, và

- chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, tùy ý sau khi pha loãng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này.

Sáng chế cũng đề cập đến chiết phẩm hublông bền với ánh sáng có thể thu được bằng phương pháp nêu trên và đề cập đến việc sử dụng chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này trong sản xuất bia.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo đó, khía cạnh thứ nhất của sáng chế liên quan đến phương pháp điều chế chiết phẩm hublông bền với ánh sáng, phương pháp này bao gồm:

- tạo chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước có chứa các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 10% theo khối lượng chất khô,
- chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, tùy ý sau khi pha loãng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, với cường độ chiếu sáng ít nhất là 50 W/m² trong thời gian ít nhất là 30 phút.

Thuật ngữ “các axit iso-alpha” được sử dụng ở đây đề cập đến các hợp chất được lựa chọn từ nhóm gồm có isohumulon, isoadhumulon, isocohumulon, pre-isohumulon, post-isohumulon và các hỗn hợp của các hợp chất này. Thuật ngữ “các axit iso-alpha” bao hàm các chất đồng phân lập thể khác nhau (các axit cis-iso-alpha và các axit trans-iso-alpha).

Thuật ngữ “các axit alpha” được sử dụng ở đây đề cập đến các hợp chất được lựa chọn từ nhóm gồm có humulon, adhumulon, cohumulon, prehumulon, posthumulon và các hỗn hợp của các hợp chất này.

Thuật ngữ “các axit beta” được sử dụng ở đây đề cập đến các hợp chất được lựa chọn từ nhóm gồm có lupulon, adlupulon, colupulon, prelupulon, và postlupulon và các hỗn hợp của các hợp chất này.

Thuật ngữ “bia” được sử dụng ở đây bao hàm cả bia có cồn và bia không có cồn.

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt của phương pháp theo sáng chế, chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng bằng ánh sáng có cường độ tối đa ở bước sóng nằm trong khoảng từ 200 nm đến 800 nm, ưu tiên hơn là nằm trong khoảng từ 250 nm đến 600 nm, ưu tiên nhất là nằm trong khoảng từ 300 nm đến 500 nm.

Ưu tiên cường độ chiếu sáng được sử dụng trong phương pháp của sáng chế lớn hơn 50 W/m^2 . Ưu tiên hơn là cường độ chiếu sáng này lớn hơn 100 W/m^2 , ưu tiên nhất là cường độ chiếu sáng này lớn hơn 200 W/m^2 .

Chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này thường được chiếu sáng với cường độ chiếu sáng nêu trên trong thời gian ít nhất là 30 phút, ưu tiên hơn là ít nhất 1 giờ và ưu tiên nhất là trong khoảng từ 2 giờ đến 48 giờ.

Trong quá trình chiếu sáng, nhiệt độ của chiết phẩm hublông này thường giữ trong khoảng từ 0°C đến 100°C , ưu tiên hơn là từ 15°C đến 80°C .

Các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng có thể thu được các kết quả đặc biệt tốt nếu chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này sau khi được pha loãng với nước. Do đó, theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

- pha loãng chiết phẩm đã được đồng phân hóa trước này với nước để tạo ra dung dịch nước; và
- chiếu sáng dung dịch nước chứa chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này.

Dung dịch nước đã được pha loãng chứa chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này thường có hàm lượng axit iso-alpha nằm trong khoảng từ $0,2 \text{ g/l}$ đến 200 g/l , ưu tiên hơn là nằm trong khoảng từ $0,5 \text{ g/l}$ đến 70 g/l và ưu tiên nhất là nằm trong khoảng từ 1 g/l đến 25 g/l khi bắt đầu chiếu sáng.

Dung dịch nước đã được pha loãng chứa chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này thường chứa nước với lượng ít nhất là 80 % theo khối lượng. Còn ưu tiên hơn là dung dịch pha loãng này chứa nước với lượng ít nhất là 90 % theo khối lượng. Ưu tiên nhất là chứa nước với lượng ít nhất là 95 % theo khối lượng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước bên với ánh sáng có thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Ưu tiên chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước bên với ánh sáng thực sự thu được bằng phương pháp này.

Chiết phẩm hublông bên với ánh sáng theo sáng chế thường chứa các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 1 %, ưu tiên hơn là ít nhất 2% và ưu tiên nhất là ít nhất 3% theo khối lượng chất khô.

Các axit alpha thường có trong chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 % đến 10 %, ưu tiên hơn là nằm trong khoảng từ 0 % đến 3 % và ưu tiên nhất là nằm trong khoảng từ 0,01 % đến 2 % theo khối lượng chất khô.

Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo sáng chế thường chứa các axit beta với lượng nằm trong khoảng từ 0 % đến 10 % theo khối lượng chất khô, ưu tiên hơn là chứa các axit beta với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 5 % theo khối lượng chất khô.

Ưu tiên lượng các axit iso-alpha khử (các axit dihydro-iso-alpha, các axit tetrahydro-iso-alpha và các axit hexahydro-iso-alpha) trong chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này không lớn hơn 10% theo khối lượng của các axit iso-alpha này. Ưu tiên hơn là lượng các axit iso-alpha khử không lớn hơn 3% theo khối lượng của các axit iso-alpha này.

Ưu tiên chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này là chiết phẩm hublông đã được tách ra từ hublông bằng phương pháp chiết xuất với cacbon đioxit lỏng hoặc siêu tới hạn.

Ưu tiên chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo sáng chế là chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước, ưu tiên hơn là chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước chứa các axit iso-alpha và các axit alpha với tỷ lệ theo khối lượng lớn hơn 10:1, ưu tiên nhất là tỷ lệ theo khối lượng lớn hơn 20:1.

Ưu tiên chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này có hàm lượng nước ít nhất là 30 % theo khối lượng, ưu tiên hơn là hàm lượng nước ít nhất 50 % theo khối lượng và ưu tiên nhất là ít nhất 70 % theo khối lượng.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất bia bền với ánh sáng, quy trình này bao gồm việc cho chiết phẩm hublông theo sáng chế vào.

Như đã được trình bày trên đây, riboflavin đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra 3-MBT do ánh sáng gây ra trong bia. Riboflavin hiện diện một cách tự nhiên trong bia và bị quang phân cực nhanh. Thực tế là, trong bia thông thường, riboflavin bị quang phân nhanh hơn rất nhiều so với các axit iso-alpha. Do đó, trong bia có hương vị "bị chiếu sáng" (light - struck beer), hàm lượng riboflavin thường bị giảm đến chỉ còn một phần của hàm lượng ban đầu thậm chí trước khi một phần đáng kể các axit iso-alpha này bị quang phân.

Ưu tiên hàm lượng riboflavin của bia bền với ánh sáng được tạo ra theo quy trình của sáng chế ít nhất là 60 µg/l. Ưu tiên nhất là hàm lượng riboflavin này nằm trong khoảng từ 80 µg/l đến 2000 µg/l.

Ưu tiên quy trình theo sáng chế tạo ra bia bền với ánh sáng chứa các axit iso-alpha với hàm lượng ít nhất là 0,1 mg/l, ưu tiên hơn là ít nhất 0,3 mg/l, còn ưu tiên hơn nữa là ít nhất 0,6 mg/l và ưu tiên nhất là ít nhất 1 mg/l. Thông thường, mức của các axit iso-alpha trong bia này sẽ không lớn hơn 30 mg/l.

Quy trình theo sáng chế thường tạo ra bia bền với ánh sáng chứa 3-metyl-2-butene-1-thiol (3-MBT) với hàm lượng nhỏ hơn 100 ng/l. Ưu tiên hơn là hàm lượng 3-MBT này nhỏ hơn 50 ng/l, ưu tiên nhất là nhỏ hơn 30 ng/l. Nồng độ của 3-MBT có thể được xác định thích hợp bằng phương pháp đã được mô tả bởi Hughes và các tác giả (Hughes P. S., Burke S. và Meacham A. E. (1997) “Aspects of the lighstruck character of beer”. Institute of Brewing, Proceedings of the 6th Central and South Africa Section, các trang từ 123 đến 128).

Trong quy trình theo sáng chế, ưu tiên chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này được bổ sung thêm vào dịch nha hoặc bia trước khi làm trong, tức là trước khi loại bỏ các chất rắn bị cuốn theo và nấm men ra khỏi bia đã được lên men này. Thông thường, việc làm trong bia đã được lên men được thực hiện bằng phương pháp lọc.

Trong quy trình nêu trên, ưu tiên chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này được cho vào dịch nha này hoặc bia với nồng độ ít nhất là 2 mg/l, ưu tiên hơn là nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mg/l đến 200 mg/l, ưu tiên nhất là nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mg/l đến 150 mg/l.

Sau khi bổ sung thêm chiết phẩm hublông bền với ánh sáng này vào dịch nha, dịch nha này được đưa vào các bước xử lý tiếp theo, bao gồm:

- lên men dịch nha này với sự trợ giúp của nấm men bia;
- làm trong bia đã được lên men này; và
- đóng gói.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa bởi các ví dụ không bị hạn chế sau đây.

Phương pháp xác định nồng độ của riboflavin

Nồng độ của riboflavin trong bia có thể được xác định bằng phương pháp UPLC-FLR (Ultra Performance Liquid Chromatography - Fluorescence) sử dụng thiết bị, các chất và các điều kiện như được mô tả dưới đây.

Thiết bị:

Hệ thống UPLC: Acquity UPLC (của hãng Waters) được trang bị cột BEH C18 (1,7 μm ; 2,1 mm x 150 mm; mã số sản phẩm của Waters: 186002353)

Đầu dò: Đầu dò Acquity Fluorescence (FLR) (của hãng Waters)

Các hóa chất:

Nước siêu tinh khiết Milli-Q® (Milli-Q® Ultrapure Water)

Axetonitril $\geq 99,9\%$ (Mã số sản phẩm của Sigma Aldrich: 34998)

Axit phosphoric $\geq 85,0\%$ (Mã số sản phẩm của Sigma Aldrich: 30417)

Riboflavin (Mã số sản phẩm của Sigma Aldrich: R-7649)

Natri dihydro phosphat monohydrat (Mã số sản phẩm của Merck: 106346)

Dung dịch đệm pH 2,7 (7,5 g natri dihydro phosphat monohydrat trong 200 mL nước siêu tinh khiết (Ultrapure Water) + 1 mL axit phosphoric trong 1000 mL nước siêu tinh khiết (Ultrapure Water))

Các điều kiện của dụng cụ UPLC:

Nhiệt độ cột: 40 °C

Thể tích bơm: 10 μL

Nhiệt độ mẫu: 10 °C

Thời gian chạy: 15 phút

Các chất rửa giải A = dung dịch đệm pH 2,7

Các chất rửa giải B = Axetonitril

Gradient:

Thời gian (phút)	Lưu lượng (mL/min)	%A	%B
0,00	0,20	95	5
10,0	0,20	95	5
10,5	0,20	15	85

12,0	0,20	15	85
12,2	0,20	95	5
15,0	0,20	95	5

Các điều kiện của đầu dò:

$$\lambda_{\text{ex}} = 444 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$$

Các mẫu thử được khử khí trước khi phân tích.

Ví dụ 1

Chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước (được gọi là “Isohop” do Barth-Haas Group cung cấp) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu. Chiết phẩm hublông này có các tính chất sau (dựa theo tờ mô tả sản phẩm của Barth-Haas Group):

- chứa các axit iso-alpha với lượng là $30 \pm 0,5 \%$ theo khối lượng
- chứa các axit alpha với lượng $< 0,7\%$
- chứa các axit beta với lượng $< 0,3\%$

Chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được pha loãng với “Nước siêu tinh khiết (Ultrapure Water) Milli-Q®” (theo tỷ lệ 1:50 theo khối lượng). Cho 16 mL chiết phẩm hublông đã được pha loãng này vào ống thủy tinh có nắp vặn ren (thủy tinh Duran, đường kính ống là 16 mm, chiều dài ống là 160 mm). Chiếu sáng đồng thời 30 ống thủy tinh này trong thời gian 32 giờ trong thiết bị Suntest XLS+ (của hãng ATLAS), sử dụng đèn Xenon. Trong quá trình chiếu sáng, có thể áp dụng các điều kiện sau đây:

- Công suất của đèn Xenon là 1700 W
- Các ống được đặt nằm ngang trong thiết bị Suntest XLS+
- Khoảng cách giữa các ống thủy tinh và đèn là 25 cm
- Lượng chiếu xạ ở mức mẫu thử được đặt ở 765 W/m^2
- Nhiệt độ của chiết phẩm hublông đã được pha loãng tăng từ nhiệt độ môi trường đến khoảng 50°C (không cố ý làm lạnh hoặc gia nhiệt trong quá trình chiếu sáng)

Ví dụ 2

Bổ sung các chiết phẩm hublông đã được chiếu sáng và không được chiếu sáng trong Ví dụ 1 vào bia chưa được cho hublông (300 mL bia chưa được cho hublông trong chai màu xanh lá cây). Chuẩn bị bia thứ nhất (bia tham chiếu) bằng cách bổ sung 20 mg/L chiết phẩm hublông không được chiếu sáng. Chuẩn bị bia thứ hai (bia bền với ánh sáng) bằng cách bổ sung 60 mg/L chiết phẩm hublông đã được chiếu sáng. Sử dụng chiết phẩm hublông đã được chiếu sáng này với nồng độ cao hơn để bù cho sự hao hụt độ đắng xảy ra do sự chiếu sáng. Profin hương vị của bia chứa chiết phẩm hublông đã được chiếu sáng này rất giống với profin hương vị của bia có chứa chiết phẩm hublông không được chiếu sáng này.

Cả hai loại bia được phơi trong ánh sáng nhân tạo bằng cách đặt các chai nằm ngang trong thiết bị Suntest XLS+ và chiếu sáng các chai này trong thời gian 24 giờ. Trong quá trình chiếu sáng, áp dụng các điều kiện giống như trong Ví dụ 1.

Trước và trong quá trình chiếu ánh sáng nhân tạo, các nồng độ của các hợp chất sau đây được xác định trong cả hai loại bia:

- các axit iso-alpha,
- riboflavin, và
- 3-MBT.

Thực hiện việc xác định các axit iso-alpha trong bia theo các phương pháp được mô tả bởi Hiệp hội các nhà hóa học sản xuất bia Hoa Kỳ (American Society of Brewing Chemists - ASBC) năm 2009 (Methods of Analysis, Xuất bản lần thứ 14): “Method Beer 23 (phần E: Các axit iso-alpha trong bia bởi HPLC)”. Hàm lượng 3-MBT này được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Hughes và các tác giả (“Aspects of the lightstruck character of beer”. Institute of Brewing, Proceedings of the 6th Central and South Africa Section (1997), các trang từ 123 đến 128).

Các kết quả của các phân tích này được tóm tắt trong Bảng 3:

Bảng 3

	Các axit iso-alpha (mg/L)	Riboflavin (µg/L)	MBT (ng/L)
Bia tham chiếu			
Chiếu sáng 0h	19,2	318	7

Chiều sáng 2h	18,8	16	309
Chiều sáng 6h	17,8	2,8	660
Chiều sáng 24h	16,0	0,3	2072
Bia bền với ánh sáng			
Chiều sáng 0h	4,5	313	8
Chiều sáng 2h	4,4	15	74
Chiều sáng 6h	4,2	2,0	137
Chiều sáng 24h	3,6	0,4	506

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế chiết phẩm hublông bền với ánh sáng, phương pháp này bao gồm:

(a) tạo chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước chứa các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 10% theo khối lượng chất khô, các axit iso-alpha này được lựa chọn từ nhóm gồm có isohumulon, isoadhumulon, isocohumulon, pre-isohumulon, post-isohumulon và các hỗn hợp của các hợp chất này; và

(b) chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, tùy ý sau khi pha loãng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này, với cường độ chiếu sáng ít nhất là 50 W/m^2 trong thời gian ít nhất là 30 phút, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này khi được pha loãng có hàm lượng axit iso-alpha nằm trong khoảng từ 0,2 g/l đến 200 g/l.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng bằng ánh sáng có cường độ tối đa ở bước sóng nằm trong khoảng từ 200 nm đến 800 nm.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng bằng ánh sáng có cường độ tối đa ở bước sóng nằm trong khoảng từ 250 nm đến 600 nm.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng bằng ánh sáng có cường độ tối đa ở bước sóng nằm trong khoảng từ 300 nm đến 500 nm.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng với cường độ chiếu sáng lớn hơn 100 W/m^2 .

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng với cường độ chiếu sáng lớn hơn 200 W/m^2 .

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được chiếu sáng với cường độ chiếu sáng được xác định này trong ít nhất 1 giờ.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ của chiết phẩm hublông này duy trì trong khoảng từ 0°C đến 100°C trong quá trình chiếu sáng.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được pha loãng với nước để tạo ra chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng này có hàm lượng axit iso-alpha nằm trong khoảng từ 0,5 g/l đến 70 g/l khi bắt đầu chiếu sáng.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng này có hàm lượng axit iso-alpha nằm trong khoảng từ 1 g/l đến 25 g/l khi bắt đầu chiếu sáng.

12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng này có chứa nước với lượng ít nhất là 80% theo khối lượng.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng này có chứa nước với lượng ít nhất là 90% theo khối lượng.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước được pha loãng này có chứa nước với lượng ít nhất là 95% theo khối lượng.

15. Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng thu được nhờ chiếu sáng chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước bao gồm các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 10% theo khối lượng chất khô ở cường độ chiếu sáng ít nhất là 50 W/m² trong thời gian ít nhất là 30 phút,

trong đó các axit iso-alpha này được lựa chọn từ nhóm gồm có isohumulon, isoadhumulon, isocohumulon, pre-isohumulon, post-isohumulon và các hỗn hợp của các chất này, và

trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này được pha loãng tùy ý trước khi chiếu sáng, và

trong đó chiết phẩm hublông đã được đồng phân hóa trước này khi được pha loãng có hàm lượng axit iso-alpha nằm trong khoảng từ 0,2 g/l đến 200 g/l.

16. Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo điểm 15, trong đó chiết phẩm này bao gồm các axit iso-alpha với lượng ít nhất là 1% theo khối lượng chất khô.

17. Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo điểm 15, trong đó chiết phẩm này bao gồm các axit alpha với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 10% theo khối lượng chất khô.
18. Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo điểm 15, trong đó chiết phẩm này bao gồm các axit beta với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 10% theo khối lượng chất khô.
19. Chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo điểm 15, trong đó chiết phẩm này bao gồm các axit iso-alpha đã được khử với nồng độ không lớn hơn 10% theo khối lượng của các axit iso-alpha này; các axit iso-alpha đã được khử này được lựa chọn từ nhóm gồm có các axit hydrođihydro-iso-alpha, các axit tetrahydro-iso-alpha, các axit hexahydro-iso-alpha và các hỗn hợp của các chất này.
20. Quy trình sản xuất bia bao gồm việc cho chiết phẩm hublông bền với ánh sáng theo điểm 15 vào bia này.
21. Quy trình theo điểm 20, trong đó chiết phẩm hublông này được đưa vào với nồng độ ít nhất là 2 mg/l.
22. Quy trình theo điểm 21, trong đó chiết phẩm hublông này được đưa vào với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mg/l đến 200 mg/l.
23. Quy trình theo điểm 22, trong đó chiết phẩm hublông này được đưa vào với nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mg/l đến 150 mg/l.