



(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)



1-0036176

(51)⁷ C07H 7/02; C07K 9/00; A23L 1/227

(13) B

(21) 1-2017-02646

(22) 26/01/2016

(86) PCT/EP2016/051543 26/01/2016

(87) WO 2016/120257 04/08/2016

(30) 15153288.4 30/01/2015 EP

(45) 25/07/2023 424

(43) 27/11/2017 356A

(73) SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (CH)

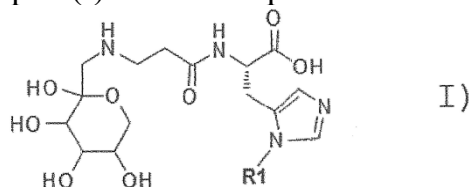
Entre-deux-Villes, 1800 Vevey, Switzerland

(72) SMARRITO-MENOZZI, Candice Marie (FR); VITON, Florian (FR); HOFMANN, Thomas (DE); KRANZ, Maximilian (DE).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) HỢP CHẤT, CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG HƯƠNG VỊ VÀ/HOẶC VỊ UMAMI CỦA SẢN PHẨM THỰC PHẨM

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất và chế phẩm được sử dụng làm tăng hương vị và vị umami (vị ngọt thịt) của các sản phẩm thực phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức tổng quát (I) và các chế phẩm có chứa các hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất và chế phẩm được sử dụng làm tăng hương vị và vị umami (vị ngọt thịt) của các sản phẩm thực phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều loại thực phẩm chúng ta ăn hàng ngày rất giàu vị umami. Umami là vị của axit amin L-glutamat và các 5'-ribonucleotit như guanosin 5'-monophosphat (GMP) và 5'-inosin monophosphat (IMP) và đôi khi còn được gọi là vị thứ năm. Từ umami xuất phát từ tiếng Nhật để diễn tả vị ngon và vị umami có thể được mô tả là “vị ngon” “vị nước dùng” hoặc “vị thịt”. Cảm giác về vị umami có được là nhờ sự hoạt hóa các tế bào thụ thể cảm nhận vị có trong các chồi vị giác, được phân bố trong các gai lưỡi khác nhau và biểu mô vòm miệng (Chandrashekar et al., 2006, *Nature*, 444, 288-294). Tác dụng của umami là làm cân bằng vị và làm tròn vị tổng thể của món ăn. Ngoài ra, umami còn làm tăng vị ngon của rất nhiều loại thực phẩm khác nhau. Có thể tìm thấy glutamat tự nhiên ví dụ trong nhiều chế phẩm thực phẩm thịt và rau củ (Ghirri et al., 2012, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(7), 872-881.).

Còn có thể tạo và/hoặc làm tăng vị umami hay vị ngon, vị thịt của thực phẩm bằng cách thêm mononatri glutamat (MSG) và/hoặc ribonucleotit GMP và IMP một cách riêng rẽ vào các công thức nấu ăn. Ngành công nghiệp thực phẩm đã phát triển nhiều chất tăng cường mùi vị chứa MSG và/hoặc các ribonucleotit này và chúng được bán rộng rãi trên toàn thế giới. Do đó, trên thị trường đã có nhiều loại chất tăng cường mùi vị chế biến sẵn khác nhau với nhiều dạng khác nhau như dạng kem, bột, lỏng, viên nén hoặc hạt để sử dụng trong các ứng dụng nấu ăn khác nhau.

Việc thêm các chất phụ gia nấu ăn này giúp tạo vị ngon và tăng các tính chất hấp dẫn vị giác cho sản phẩm thực phẩm mà nó được thêm vào. Trong thực tế, trên toàn thế giới, vị ngon và mùi vị hấp dẫn được coi là một trong những thuộc tính chủ yếu của món ăn chất lượng cao. Tuy nhiên, tại nhiều nơi trên thế giới, việc thêm MSG và/hoặc các ribonucleotit đã nhận được phản hồi không tốt trên các phương tiện truyền

thông và người tiêu dùng ngày càng nhận thức tiêu cực về việc này. Mặc dù MSG và các ribonucleotit xuất hiện tự nhiên trong nhiều loại thực phẩm, như trong cà chua và các sản phẩm thịt, và đã được một số tổ chức chứng minh là an toàn, bao gồm Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu (EFSA), bài viết trong New England Journal of Medicine (Kwok, RHM, 1968 New England Journal of Medicine, 278 (14), 796) đã khơi mào suy đoán của người tiêu dùng về tác dụng có hại của MSG và ribonucleotit, dẫn đến việc nhiều người tiêu dùng từ chối các sản phẩm chứa lượng lớn các hợp chất bổ sung này. Do đó, rất cần các giải pháp công nghiệp cho phép giảm sử dụng MSG và ribonucleotit trong thực phẩm hoặc sản phẩm làm tăng mùi vị nhưng không làm ảnh hưởng đến vị umami và vẫn đảm bảo sự thơm ngon hơn hẳn của các sản phẩm dùng trong nấu ăn này.

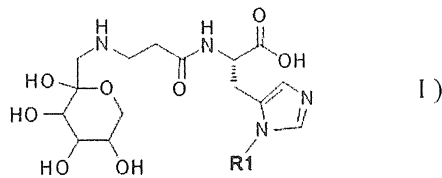
Ví dụ, trong một ấn phẩm khoa học mới đây từ A. Dunkel và T. Hofmann (Dunkel và Hofmann, 2009, J. Agric. Food Chem 2009, 57, 9867-9877), sự tách phân đoạn theo cảm giác của súp gà chung cách thủy mới nấu giúp xác định các dipeptit β -alanyl là L-anserine, L-carnosin và β -alanylglyxin là các nhân tố góp phần tạo nên mùi vị thịt trắng, chua và đậm đà trong miệng. Phân tích định lượng, sau đó là các thí nghiệm tái tổ hợp và bỏ bớt mùi vị, đã lần đầu tiên cho thấy, khi kết hợp cùng với axit L-glutamic và các ion natri và/hoặc kali, ba peptit β -alanyl này với hàm lượng dưới ngưỡng sẽ giúp tăng cảm giác chua đậm đà điển hình trong miệng và vị thịt trắng vốn có của thịt gia cầm. Đây là bước đầu trong công cuộc tìm kiếm các hợp chất mới có khả năng mang lại hương vị đậm đà và tăng hiệu quả tạo mùi vị umami của MSG, và từ đó cho phép giảm sử dụng MSG.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế này là nhằm cải thiện hiện trạng của ngành và cung cấp một giải pháp cải tiến hoặc giải pháp khác so với kỹ thuật trước đây để khắc phục ít nhất một số hạn chế trong các hạn chế mô tả ở trên. Cụ thể, mục đích của sáng chế là cung cấp một giải pháp khác hoặc một giải pháp cải tiến nhằm làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của một sản phẩm thực phẩm.

Đối tượng của sáng chế là nội dung chính của các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập. Các điểm phụ thuộc sẽ phát triển thêm ý tưởng của sáng chế.

Theo đó, sáng chế cung cấp, trong phương án thứ nhất, hợp chất có công thức tổng quát I,



trong đó R1 là hydro, nhóm C₁, C₂, C₃, hoặc C₄ alkyl; hoặc muối của hợp chất đã nêu.

Trong phương án thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất đã nêu có công thức tổng quát I) với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, ít nhất bằng 1,7 mg/g, ít nhất bằng 2 mg/g, ít nhất bằng 2,5 mg/g, ít nhất bằng 3 mg/g, ít nhất bằng 3,5 mg/g, hoặc ít nhất bằng 5 mg/g tổng khối lượng chế phẩm.

Các phương án khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất đã nêu nhằm làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm.

Các phương án khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm chứa hợp chất đã nêu với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, ít nhất bằng 1,7 mg/g, ít nhất bằng 2 mg/g, ít nhất bằng 2,5 mg/g, ít nhất bằng 3 mg/g, ít nhất bằng 3,5 mg/g, hoặc ít nhất bằng 5 mg/g nhằm làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm.

Một phương án khác của sáng chế là phương pháp làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm dùng trong nấu ăn, bao gồm bước thêm hợp chất đã nêu hoặc chế phẩm chứa hợp chất đã nêu vào sản phẩm thực phẩm.

Các nhà sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng một số liên hợp với đường của các dipeptit β -alanyl có tác dụng làm tăng hương vị mạnh hơn nhiều so với các aglycon tương ứng của chúng. Trong thực tế, các liên hợp với đường này ở các mức ngưỡng thấp hơn nhiều so với các aglycon tương ứng của chúng làm tăng sự cảm nhận umami và cảm ứng mùi vị thịt trắng, chua, đậm đà trong miệng của công thức nấu ăn. Các phân tử đường-dipeptit β -alanyl thường được sản sinh ngay trong quá trình xử lý nhiệt nguyên liệu thực phẩm bằng cách ngưng tụ glucoza với các dipeptit β -alanyl, ví dụ như carnosin và anserine. Ví dụ, các nhà sáng chế đã nhận dạng các phân tử này trong một món súp truyền thống là món pot-au-feu (bò hầm kiểu Pháp) với hàm lượng bằng khoảng 7-10 $\mu\text{mol/L}$, tương đương khoảng 2,7 đến 3,9 $\mu\text{g/g}$. Các aglycon tương ứng, tức là các dipeptit β -alanyl, đã được nhận dạng, ví dụ, trong nước bò hầm hoặc trong nước dùng gà và đã được mô tả như trên là cảm ứng cảm giác vị chua và vị chất trong miệng (Sonntag et al., 2010, J. Agric. Food Chem. 58, 6341-6350; Dunkel et al., 2009, J. Agric. Food Chem., 57, 9867-9877). Tuy nhiên, các

mức ngưỡng làm tăng mùi vị của các dipeptit β -alanyl cụ thể này cao hơn nhiều so với các dipeptit trong các liên hợp với đường tương ứng của chúng. Các bằng chứng được trình bày ở phần Ví dụ dưới đây. Có thể thấy rằng, các phân tử được mô tả trong sáng chế là các chất tăng cường hương vị và vị umami hiệu lực hơn các dipeptit β -alanyl đã biết. Chúng còn cho phép giảm lượng và giảm việc sử dụng MSG và/hoặc ribonucleotit trong các sản phẩm thực phẩm dùng trong nấu ăn mà không làm ảnh hưởng đến hương vị đậm đà và/hoặc không giảm mùi vị umami điển hình và mong muốn của các sản phẩm này. Chúng cũng cho phép tạo các thực phẩm cô đặc có vị ngon umami không chứa hoặc chứa MSG và/hoặc ribonucleotit với lượng ít hơn nhiều, đồng thời vẫn tạo được vị umami mạnh và điển hình nếu sử dụng cho thực phẩm. Chúng thậm chí còn cho phép tạo ra các thực phẩm cô đặc tạo vị ngon umami mạnh hơn và cô đặc hơn cho sản phẩm thực phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sắc ký đồ HPLC-UV của carnosin được xử lý nhiệt với glucoza.

Fig. 2 thể hiện sắc ký đồ HPLC-UV của muối nitrat của anserine được xử lý nhiệt với glucoza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức tổng quát I), trong đó R1 là hydro, nhóm C₁, C₂, C₃, hoặc C₄ alkyl; hoặc muối của hợp chất đã nêu. Trong một phương án, nhóm R1 của hợp chất của sáng chế là hydro hoặc nhóm metyl. Tên hóa học của hai hợp chất tương ứng này lần lượt là 1-deoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin và 1-deoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin.

Phương án thứ hai của sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất đã nêu có công thức tổng quát I) với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, ít nhất bằng 1,7 mg/g, ít nhất bằng 2 mg/g, ít nhất bằng 2,5 mg/g, ít nhất bằng 3 mg/g, ít nhất bằng 3,5 mg/g, hoặc ít nhất bằng 5 mg/g tổng khối lượng chế phẩm.

Trong một phương án, chế phẩm của sáng chế là dịch chiết từ nguyên liệu thực vật và/hoặc thịt. Ví dụ, chế phẩm là dịch chiết từ thịt bò, thịt gà, thịt lợn hoặc kết hợp của chúng.

Trong phương án khác, chế phẩm của sáng chế là kết quả của phản ứng hương vị. Trong tài liệu này, thuật ngữ “phản ứng hương vị” chỉ một phản ứng hóa học xảy ra giữa ít nhất một đường khử và ít nhất một axit amin hoặc protein. Thông thường,

phản ứng hóa học này xảy ra trong quá trình gia nhiệt và thường được gọi là phản ứng Maillard. Trong một ví dụ, phản ứng hương vị là phản ứng Maillard.

Trong một phương án ưu tiên, chế phẩm của sáng chế được dùng trong thực phẩm. Với từ “dùng trong thực phẩm”, các nhà sáng chế có ý là chế phẩm phù hợp cho con người tiêu thụ, ví dụ, một cách trực tiếp, dưới dạng cô đặc, và/hoặc được sử dụng bằng cách pha loãng trong thực phẩm.

Ví dụ, chế phẩm của sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm gia vị sử dụng trong nấu ăn, chất phụ gia nấu ăn, nước sốt hoặc súp cô đặc, sản phẩm thức ăn khô hay ướt dành cho thú cưng.

Các phương án khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất đã nêu nhằm làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm. Sản phẩm thực phẩm này có thể là thực phẩm được chế biến sẵn. Nó cũng có thể là hương vị cô đặc sử dụng để làm gia vị cho một sản phẩm thực phẩm khác. Điểm thuận lợi là, hợp chất của sáng chế có thể được sử dụng để thêm vào sản phẩm gia vị, phụ gia nấu ăn hoặc sản phẩm thực phẩm cô đặc. Theo đó, sản phẩm gia vị, phụ gia nấu ăn hoặc thực phẩm cô đặc này giúp tạo vị umami mạnh hơn cho một thực phẩm khác.

Các phương án khác của sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng chế phẩm chứa hợp chất đã nêu với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, ít nhất bằng 1,7 mg/g, ít nhất bằng 2 mg/g, ít nhất bằng 2,5 mg/g, ít nhất bằng 3 mg/g, ít nhất bằng 3,5 mg/g, hoặc ít nhất bằng 5 mg/g tổng khối lượng chế phẩm, nhằm làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của thực phẩm. Điểm thuận lợi là sản phẩm thực phẩm này có thể là thực phẩm được chế biến sẵn. Việc sử dụng sáng chế có ưu điểm là sáng chế cho phép sử dụng các sản phẩm chiết xuất tự nhiên, các dịch chiết này, ví dụ, đã được làm giàu các hợp chất đã nêu để tạo hương vị và làm tăng vị umami tự nhiên của các thực phẩm đó.

Một phương án khác của sáng chế là phương pháp làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm dùng trong nấu ăn, bao gồm bước thêm hợp chất đã nêu hoặc chế phẩm chứa hợp chất đã nêu vào sản phẩm thực phẩm. Sản phẩm thực phẩm có thể là thực phẩm chế biến sẵn hoặc hương vị cô đặc.

Ví dụ, hàm lượng cuối của hợp chất đã nêu trong sản phẩm thực phẩm ít nhất bằng 1 mg/g, ít nhất bằng 1,7 mg/g, ít nhất bằng 2 mg/g, ít nhất bằng 2,5 mg/g, ít nhất bằng 3 mg/g, ít nhất bằng 3,5 mg/g, hoặc ít nhất bằng 5 mg/g khối lượng chế phẩm.

Điều này giúp tạo ra, ví dụ, các sản phẩm gia vị thực phẩm và các sản phẩm hương vị cô đặc có thể tạo vị umami mạnh cho sản phẩm thực phẩm khác.

Các chuyên gia trong ngành sẽ hiểu rằng họ có thể kết hợp tùy ý tất cả các đặc điểm của sáng chế được công bố trong bản mô tả này. Cụ thể, các đặc điểm được mô tả cho các sản phẩm của sáng chế có thể được kết hợp với việc sử dụng và phương pháp của sáng chế, và ngược lại. Ngoài ra có thể kết hợp các đặc điểm mô tả về các phương án khác nhau của sáng chế.

Các ưu điểm và đặc điểm khác của sáng chế được trình bày rõ trong các hình vẽ và ví dụ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng hợp 1-deoxy-D-fructosyl-*N*- β -alanyl-L-histidin từ glucoza và carnosin (β -alanyl-L-histidin)

Hóa chất: Natri bisulphit và glyxerol được mua từ Sigma, glucoza từ SDfine Chemicals, carnosin từ ChemImprex, metanol và axit axetic từ Merck. Tất cả các thuốc thử được sử dụng có bán trên thị trường được cung cấp từ các nhà cung cấp tương ứng.

Thực hiện sắc ký lớp mỏng phân tích (TLC) trên các đĩa RP-18 F254s (Merck). Các đĩa TLC được cho hiển thị theo tia UV bước sóng ngắn, thuốc nhuộm Ninhydrin.

Phổ ^1H NMR (360,13 MHz) và ^{13}C NMR (90,56 MHz) được ghi lại trên phổ kế Bruker DPX-360 được trang bị đầu dò z-gradien đa nhân bằng thông rộng. Độ dịch chuyển hóa học (tính theo ppm) được biểu hiện theo tham chiếu trong (TMS hoặc TSP). Các độ bội được báo cáo như sau: s= mức đơn, d= mức đôi, t= mức ba, q= bội bốn, m= đa bội, bs= mức đơn rộng.

D-Glucoza (23 g, 127,37 mmol, 2,8 đương lượng) và natri bisulfit (1,6 g, 12,389 mmol, 0,28 đương lượng) được tạo huyền phù trong metanol (38 mL) và glyxerol (19 mL). Sau khi khuấy trong 30 phút ở 100°C, carnosin (10 g, 44,22 mmol, 1,0 đương lượng) và axit axetic (5,1 mL) được thêm vào và hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt trong 3,5 giờ ở 100°C. Khối lượng phản ứng sau đó được làm mát và pha loãng với 38 mL nước. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cột trong nhựa trao đổi ion Amberlite IRN-77 (100 g). NH_3 0-0,4% được sử dụng làm gradien trong nước để rửa giải. Cuối cùng, 6,8 g 1-deoxy-D-fructosyl-*N*- β -alanyl-L-histidin được phân lập (39,62%); Rf (n-Butanol:

Axit axetic: Nước, 3: 2: 2): 0,21; MS (M^+): m/z 388,16; 1H NMR (đoteri oxit) δ 2,77 [m, 2H], 3,13 [dd, $J = 15,4, 8,2$ Hz, 1H], 3,21-3,27 [m, 1H], 3,28-3,32 [m, 2H], 3,33-3,44 [m, 2H], 3,63-3,75 [m, 1H], 3,76-3,85 [m, 2H], 3,87-3,91 [m, 1H], 3,99-4,03 [m, 2H], 4,53 [dd, $J = 8,2, 5,2$ Hz, 1H], 7,28 [d, $J = 1,0$ Hz, 1H], 8,61 [d, $J = 1,4$ Hz, 1H]; ^{13}C NMR (đoteri oxit) δ 26,98, 30,26, 44,28, 53,01, 53,92, 63,91, 68,80, 69,20, 69,76, 95,21, 116,65, 129,49, 133,15, 171,60, 176,13.

Ví dụ 2: Điều chế 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin từ glucoza và carnosin (β -alanyl-L-histidin)

Hỗn hợp của carnosin (226 mg; 1 mmol; 1 đương lượng) và glucoza (360 mg; 2 mmol; 1 đương lượng) trong 20 mL dung dịch đệm Na_2HPO_4 (0,5 mol/L, pH 7,0) được gia nhiệt trong một bình kín ở $80^\circ C$ trong 3 giờ. Dung môi sau đó được cho bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và kết tủa thu được được cho đông khô. Các phần phân ước của bột đông khô được cho hòa tan trong nước sau khi dùng sóng siêu âm trong 10 phút và được lọc (0,45 μm). Các dung dịch sau đó được cất phân đoạn bằng sắc ký lỏng tương tác kỵ nước bán điều chế (HILIC-HPLC) sử dụng cột 300 x đường kính trong 21,5 mm, 10 μm , TSKgel Amide-80 (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Đức) được trang bị cột bảo vệ 75 x đường kính trong 21,5, 10 μm , (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Đức). Giám sát dòng chảy bằng đầu dò ELSD (Evaporative Light Scattering Detector - Đầu dò tán xạ ánh sáng bay hơi) và điều chỉnh lưu lượng đến khi đạt 8 $cm^3/phút$ (8 mL/phút), sử dụng gradien gồm có axit formic chứa nước (1% trong nước, dung môi A) và axetonitril (dung môi B). Bắt đầu bằng hỗn hợp gồm có 75% B và 25% A trong 10 phút, gradien sau đó được giảm xuống còn 0% B và 80% A trong vòng 10 phút nữa. Sau khi giữ các điều kiện này trong 5 phút, gradien được cho tăng đến khi đạt 75% B và 25% A trong vòng 8 phút. Tinh chế được 6 phần chiết như được trình bày trong Fig.1.

Phân tử tương ứng với phần chiết F5 được xác định là carnosin trong khi phân tử F6 được xác định là 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin (dựa trên dữ liệu LC-MS và NMR).

Ví dụ 3: Điều chế 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin từ glucoza và carnosin (β -alanyl-L-histidin)

Hỗn hợp của carnosin (905 mg; 4 mmol) và kali hydroxit (224 mg; 4 mmol) trong 100 mL metanol được hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm mát xuống nhiệt độ phòng, lọc để

lấy ra chất kết tủa và cô đặc lớp bề mặt trong điều kiện áp suất giảm, thu được muối kali carnosin. Sau đó, hỗn hợp muối kali carnosin (2 mmol) và glucoza (360 mg; 2 mmol) trong metanol (50 mL, pH 5,0 với axit formic) được gia nhiệt ở 80°C trong một bình kín trong 2 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi trong điều kiện áp suất giảm, kết tủa được hòa tan trong nước và được đông khô. Tinh chế sản phẩm phản ứng trong các điều kiện tương tự như các điều kiện trong Ví dụ 2.

Ví dụ 4: Điều chế 1-deoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin từ glucoza và anserine (β -alanyl-N-metyl-L-histidin)

D-Glucoza (127,37 mmol, 2,8 đương lượng) và natri bisulfit (12,389 mmol, 0,28 đương lượng) được tạo huyền phù trong metanol (38 mL) và glyxerol (19 mL). Sau khi khuấy trong 30 phút ở 100°C, muối nitrat của anserine (44,22 mmol, 1,0 đương lượng, Bachem) và axit axetic (5,1 mL) được thêm và gia nhiệt hỗn hợp thu được trong 3,5 giờ ở 100°C. Sau đó khối lượng phản ứng được làm mát và được pha loãng với nước (38 mL). Tinh chế hỗn hợp bằng sắc ký lỏng điều chế sử dụng cột Phenomenex Luna 5 μ HILIC 250 x 4,60 mm với dung dịch đệm NH₄Ac 5 mM trong nước (dung môi A) và axetonitril (90%, dung môi B), được điều chỉnh để đạt độ pH 5,8. Sắc ký đồ thu được và gradien được trình bày trong Fig.2. Đỉnh thứ nhất được xác định là muối nitrat trong khi đỉnh 2 là 1-deoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin mong muốn và đỉnh 3 tương ứng với anserine không phản ứng. Cuối cùng, 2,6 g 1-deoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin được phân lập (15%);

LC-MS (ESI): m/z 401,13 (100, [M-H]⁻); ¹H NMR (400 MHz, 300 K, đoteri oxit) δ 2,70-2,86 [m, 2H], 3,09 [dd, J = 15,8, 8,3 Hz, 1H], 3,26 [dd, J = 15,8, 5,0 Hz, 1H], 3,34-3,40 [m, 2H], 3,36 [m, 2H], 3,71-3,77 [m, 1H], 3,78-3,83 [m, 1H], 3,85 [s, 3H], 3,88-3,92 [m, 1H], 3,99-4,05 [m, 2H], 4,51 [dd, J = 8,5, 5,5 Hz, 1H], 7,24 [s, 1H], 8,54 [s, 1H]; ¹³C NMR (100 MHz, 300 K, đoteri oxit) δ 28,77, 33,28, 35,87, 47,24, 55,96, 56,18, 66,85, 71,74, 72,14, 72,68, 98,18, 120,99, 133,96, 138,25, 174,55, 179,19.

Ví dụ 5: Đánh giá cảm quan carnosin (β -alanyl-L-histidin) và anserine (β -alanyl-N-metyl-L-histidin) trong nước dùng mẫu

Các thí nghiệm về cảm quan được thực hiện trong phòng hội đồng cảm quan ở 20-25°C. Để tránh cảm giác vị hoặc hương thơm sau mũi, kẹp mũi được sử dụng. Hội

đồng cảm quan gồm 8 đến 14 người được đào tạo. Hội đồng được đào tạo để đánh giá vị của các dung dịch chứa nước (mỗi dung dịch là 1 mL) của các hợp chất có vị tiêu chuẩn sau đây bằng cách sử dụng phép thử tam giác: theo tuần tự là sacaroza (50 mmol/L) và L-alanin (15 mmol/L), cho vị ngọt; axit lactic (20 mmol/L) cho vị chua; NaCl (12 mmol/L) cho vị mặn; lần lượt cafein (1 mmol/L) và quinin hydroclorua (0,05 mmol/L) cho vị đắng; natri glutamat (8 mmol/L, pH 5,7) cho vị umami; và tanin (0,05%) cho vị chát. Cảm giác “vị thịt trắng” trong miệng được đánh giá trong dung dịch nước dùng mẫu được điều chế từ mononatri glutamat monohydrat (1,9 g/L), dịch chiết nấm men (2,1 g/L), maltodextrin (6,375 g/L) và natri clorua (2,9 g/L) trong nước đóng chai (pH 5,9).

Xác định nồng độ ngưỡng mùi vị của β -alanyl-L-histidin trong nước dùng mẫu bằng cách sử dụng thí nghiệm ba phương án luân phiên với hai dung dịch không chứa chất thử nghiệm và một mẫu có các nồng độ β -alanyl-L-histidin tăng dần. Tìm được nồng độ ngưỡng mùi vị là 22'700 $\mu\text{mol/L}$ (5,3 mg/g) để có vị chua đậm đà và cảm giác vị thịt trắng trong miệng.

Có thể xác định nồng độ ngưỡng mùi vị của β -alanyl-N-metyl-L-histidin bằng phương pháp tương tự như phương pháp mô tả trên đây đối với β -alanyl-L-histidin.

Ví dụ 6: Đánh giá cảm quan 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin và 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin trong nước dùng mẫu

Xác định nồng độ ngưỡng mùi vị của 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin trong nước dùng mẫu như mô tả trong Ví dụ 5 và nồng độ tìm được là 4'400 $\mu\text{mol/L}$ (1,7 mg/g) để có vị chua đậm đà và cảm giác vị thịt trắng trong miệng. Giá trị ngưỡng mùi vị này thấp hơn đáng kể so với mức ngưỡng 22'700 $\mu\text{mol/L}$ (5,3 mg/g) được xác định cho β -alanyl-L-histidin tương ứng trong cùng hệ mẫu thử nghiệm (xem Ví dụ 5). Trong thực tế, giá trị này tương ứng với giá trị nồng độ ngưỡng mùi vị đã được giảm theo hệ số bằng khoảng 5.

Kết quả này có nghĩa là cần một lượng phân tử 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin ít hơn khoảng 5 lần so với β -alanyl-L-histidin tương ứng trong cùng điều kiện để tạo cùng tác dụng tăng cường hương vị và mùi vị umami trong một sản phẩm thực phẩm.

Có thể quan sát được kết quả tương tự và mức giảm định lượng giống nhau khi kiểm tra và so sánh các giá trị ngưỡng mùi vị của 1-đeoxy-D-fructosyl-*N*- β -alanyl-*N*-methyl-L-histidin với anserine (β -alanyl-*N*-methyl-L-histidin).

Ví dụ 7: Xác định và định lượng 1-đeoxy-D-fructosyl-*N*- β -alanyl-L-histidin trong nước dùng thịt

Chế biến nước dùng trong món bò hầm kiểu Pháp: Các nguyên liệu (từ chợ địa phương) và khối lượng của chúng được tổng hợp trong Bảng 1. Các miếng thịt được ngâm trong 5 L nước lạnh. 22,5 g NaCl được thêm vào và hỗn hợp được nấu sôi. Sau 2 giờ, thêm rau củ cắt nhỏ vào nước dùng và nấu sôi thêm một giờ nữa. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ các phần cứng.

Bảng 1: Nguyên liệu món bò hầm kiểu Pháp

Rau củ		Thịt	
Tỏi tây	140 g	Nạc vai bò	624 g
Hành tây	45 g	Thịt đầu vai cuộn bò	62 g
Cần tây	108 g	Tủy xương	180 g
Củ cải tròn	88 g	Khớp xương bê	190 g
Đinh hương	0,35 g	Đuôi bò	303 g
Cà rốt	136 g	Sườn lưng thịt bò	251 g

Chế biến nước dùng thịt: Các miếng thịt được ngâm trong 5 L nước lạnh (Bảng 1). 22,5 g NaCl được thêm vào và hỗn hợp được nấu sôi trong 3 giờ. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ các phần cứng.

50 mL nước dùng được pha với một lượng chuẩn được gắn nhãn $^{13}\text{C}_6$, được cho vào ống Strata C18-E và pha loãng với nước để đạt tỷ lệ pha loãng hiệu quả bằng 1:10. Thực hiện định lượng bằng phân tích pha loãng đồng vị bền, sử dụng HPLC-MS được trang bị cột TSKgel-Amide 80 (3 μm , 2 mm x 150 mm từ Tosoh Bioscience, Stuttgart, Đức) và cột bảo vệ TSKgel-Amide 80 (3 μm , 2 mm x 10 mm từ Tosoh Bioscience, Stuttgart, Đức). Dung môi rửa giải hấp A là hỗn hợp của axetonitril với axit formic 1,0%

và dung môi rửa giải hấp B là nước và axit formic 1,0%. Thể tích tiêm là 3 μ L. Lưu lượng là 0,2 cm³/phút (0,2 mL/phút). Gradient dung môi bắt đầu với 95% A từ 0 tới 5 phút, sau đó 95-5% A từ 5 đến 15 phút, 5% A trong 10 phút, 5-95% từ 27 đến 30 phút. Bảng 2 tổng hợp các điều kiện MS.

Bảng 2: Chuyển dịch khối

Chất	MW [Da]	Q1 $\rightarrow$ Q3 [m/z]	DP ^a	CE ^b	CXP ^c
1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin	388	389 $\rightarrow$ 305	71	25	4

^aThế phân mảnh; ^bNăng lượng va chạm; ^cThế đầu ra

Tìm được 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin với hàm lượng 10 và 7 μ mol/L trong nước dùng thịt và nước dùng bò hầm kiểu Pháp. Hàm lượng này tương ứng với hàm lượng nước dùng lần lượt bằng khoảng 2,7 và 3,9 μ g/g.

Ví dụ 8: Các chế phẩm gia vị

Súp gà được chế biến bằng cách hòa tan 6 g bột vị gà (công thức chi tiết được trình bày trong Bảng 3) và 1 g mononatri glutamat trong 500 mL nước nóng. 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin hoặc 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin được thêm vào với hàm lượng 2 g/L.

Bảng 3: Chế phẩm bột vị gà

Thành phần	Khối lượng (%)
Bột thịt gà	30
Tinh bột	1,52
Hương vị	2,58
Bột cần tây	0,50
Bột tỏi	0,90

Mỡ gà	8,00
Maltodextrin	56,50
Tổng	100

Mười hai người trong hội đồng thực hiện đánh giá cảm quan, trước đó khả năng cảm quan của họ đã được sàng lọc. Những người trong hội đồng được yêu cầu nếm 2 món súp gà, một súp không chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin và một súp chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin (2 g/L). Những người trong hội đồng được yêu cầu mô tả sự khác nhau về cảm giác nếu có.

Hội đồng cảm quan kết luận rằng súp gà có chứa và không chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin có sự khác biệt rõ rệt và việc bổ sung 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin đã làm tăng đáng kể vị thịt gà luộc và vị thịt.

Thực hiện đánh giá cảm quan tương tự đối với các mẫu súp gà có chứa và không chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin trong nước dùng gà hàm lượng 2 g/L. Hội đồng cảm quan kết luận rằng súp gà có chứa và không chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin có sự khác biệt rõ rệt và việc bổ sung 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin đã làm tăng đáng kể vị thịt gà luộc và vị thịt.

Ví dụ 9: Các chế phẩm gia vị

Súp cà chua được chế biến bằng cách hòa tan 6 g bột vị cà chua (công thức chi tiết được trình bày trong Bảng 4) trong 500 mL nước nóng. 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin hoặc 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin được thêm với hàm lượng 2 g/L vào súp.

Bảng 4: Chế phẩm bột súp cà chua

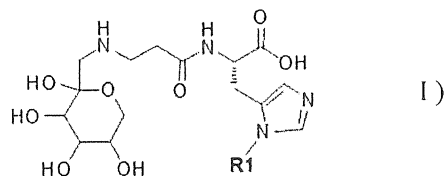
Thành phần	Khối lượng (g)
Dịch chiết nấm men	0,036
Đường trắng	0,348
Hương vị	0,629

Bột cà chua	0,03
Bột lúa mì	0,562
Tinh bột ngô	0,247
Gôm guar	0,012
Bột gia vị	0,071
Maltodextrin	0,038
Dầu hướng dương	0,022
Tổng	2

Hội đồng cảm quan kết luận rằng súp cà chua có chứa và không chứa 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin hoặc 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin có sự khác biệt rõ rệt; và sự bổ sung 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-L-histidin hoặc 1-đeoxy-D-fructosyl-N- β -alanyl-N-metyl-L-histidin làm tăng đáng kể vị ngon và hương vị cho các món súp này.

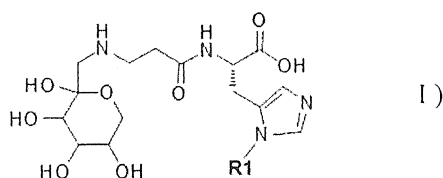
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức tổng quát I:



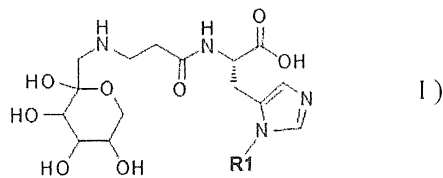
trong đó R1 là hydro, nhóm C₁, C₂, C₃, hoặc C₄ alkyl; hoặc muối của hợp chất này.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R1 là hydro hoặc nhóm metyl; hoặc muối của hợp chất này.
3. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, trong đó chế phẩm này được dùng trong thực phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm gia vị sử dụng trong nấu ăn, chất phụ gia nấu ăn, nước sốt hoặc súp cô đặc, sản phẩm thức ăn khô hoặc ướt dành cho thú cưng.
5. Hợp chất có công thức tổng quát I:



trong đó R1 là hydro, nhóm C₁, C₂, C₃, hoặc C₄ alkyl; hoặc muối của hợp chất này, để làm tăng hương vị của sản phẩm thực phẩm.

6. Hợp chất có công thức tổng quát I:



trong đó R1 là hydro, nhóm C₁, C₂, C₃, hoặc C₄ alkyl; hoặc muối của hợp chất này, để làm tăng vị umami của sản phẩm thực phẩm.

7. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, trong đó chế phẩm này được dùng trong thực phẩm để làm tăng hương vị của sản phẩm thực phẩm.
8. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 với lượng ít nhất bằng 1 mg/g, trong đó chế phẩm này được dùng trong thực phẩm để làm tăng vị umami của sản phẩm thực phẩm.
9. Phương pháp làm tăng hương vị và/hoặc vị umami của sản phẩm thực phẩm dùng trong nấu ăn, bao gồm bước thêm hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 hoặc chế phẩm theo điểm 3 hoặc 4 vào sản phẩm thực phẩm.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nồng độ cuối của hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 trong sản phẩm thực phẩm ít nhất bằng 1 mg/g.

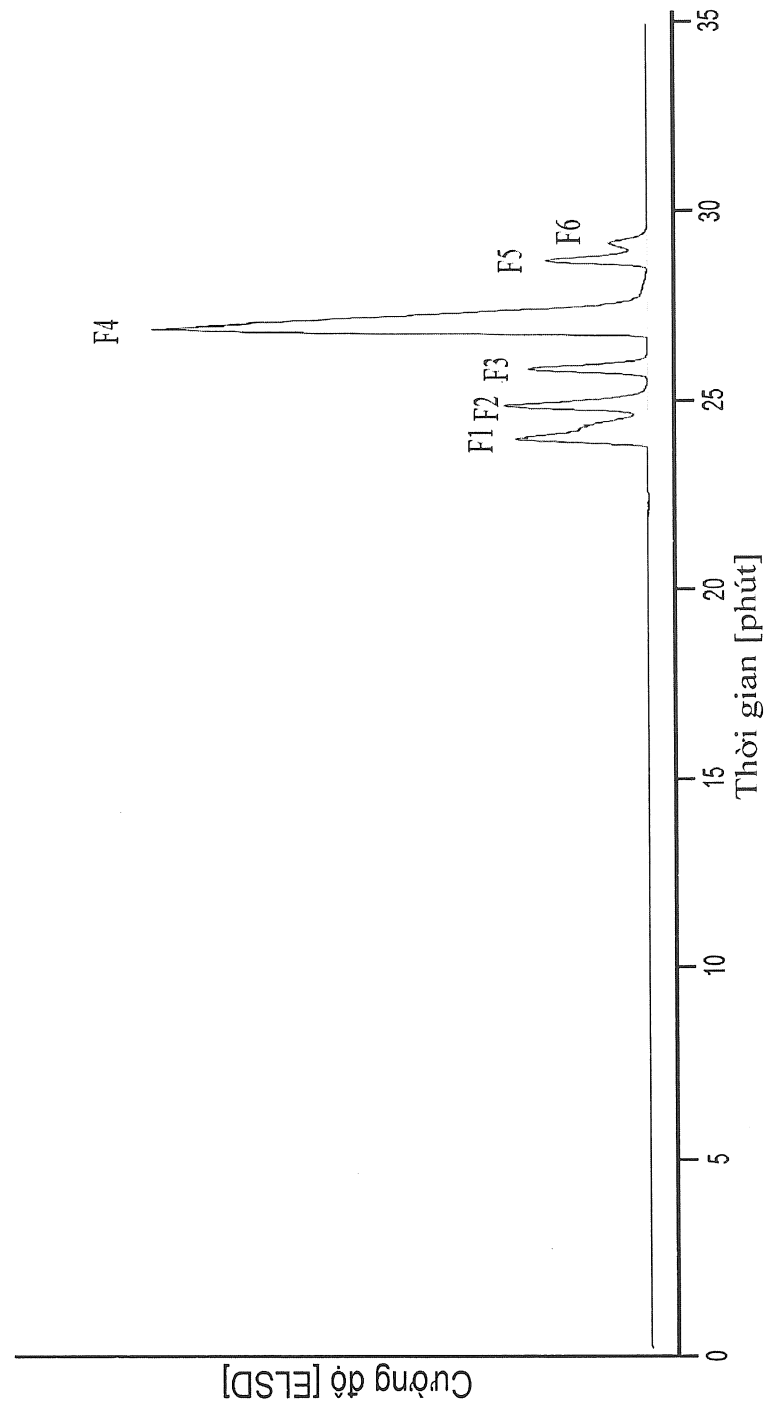


Fig.1

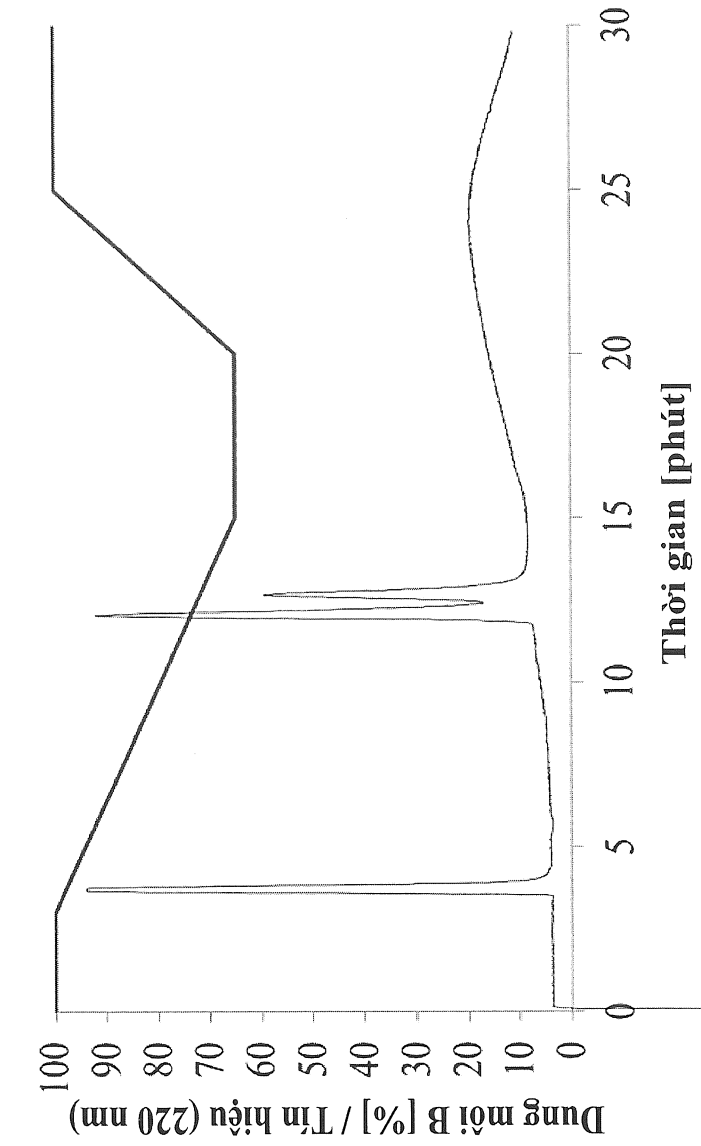


Fig.2