



(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)



1-0049691

(51)^{2020.01} C12C 12/04; C12H 3/00; C12C 5/02

(13) B

(21) 1-2021-00842

(22) 10/09/2018

(86) PCT/NL2018/050587 10/09/2018

(87) WO 2020/055234 19/03/2020

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/08/2021 401A

(73) Heineken Supply Chain B.V. (NL)

Tweede Weteringplantsoen 21, 1017 ZD Amsterdam, the Netherlands

(72) BROUWER, Eric Richard (NL); SMIT, Hilda Els (NL); DODERER, Albert (NL);
BEKKERS, Augustinus Cornelius Aldegond Petrus Albert (NL).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BIA CÓ ĐỘ CỒN THẤP VỚI HƯƠNG VỊ NƯỚC Ủ MEN GIẢM VÀ PHƯƠNG
PHÁP TẠO RA BIA NÀY

(21) 1-2021-00842

(57) Sáng chế đề cập đến bia có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, chứa etyl-2-methylpentanoat (EMP) với lượng bằng ít nhất 0,001 $\mu\text{g/L}$. EMP được phát hiện là có tác dụng che hương vị nước ủ men mạnh. Bia theo sáng chế có hương vị nước ủ men yếu và ít hương vị quá mạnh hơn, và nhìn chung được coi là tươi mới. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra bia này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến este có đặc tính che vị nước ủ men (hèm) đặc biệt tốt, được phát hiện là thành phần đóng góp quan trọng cho vị bia.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bia là một trong những đồ uống có cồn phổ biến nhất trên toàn thế giới. Bia được tạo ra bằng cách lên men chất nền nước chứa đường có nguồn gốc từ hạt, sử dụng nấm men chuyển hoá đường thành etanol (“rượu”). Nhìn chung, quy trình sản xuất bia đã được biết đến. Bia thường được làm từ ngũ cốc như đại mạch, mặc dù các loại ngũ cốc khác như lúa mì hoặc cao lương cũng có thể được sử dụng. Bia thường được sản xuất bằng quy trình bao gồm các bước cơ bản sau đây: ngâm hỗn hợp hạt ngũ cốc với nước để tạo ra hỗn hợp ngâm; tách hỗn hợp ngâm này thành nước ủ men và hạt đã sử dụng; đun sôi nước ủ men để tạo ra nước ủ men đun; lên men nước ủ men đun này bằng nấm men sống (như *Saccharomyces pastorianus* hoặc *Saccharomyces cerevisiae*) để tạo ra nước ủ men lên men; dùng nước ủ men lên men này trong một hoặc nhiều bước tiếp theo của quy trình (ví dụ, làm chín và lọc) để tạo ra bia; và đóng gói bia trong đồ chứa được bịt kín, ví dụ, chai, lon hoặc thùng.

Theo quy trình lấy ví dụ để tạo ra bia mạch nha đại mạch, đại mạch được ủ mạch nha, nghĩa là nó được làm nảy mầm và sau đó được làm khô (“sấy”), để tạo ra mạch nha. Quy trình này quan trọng cho quá trình tạo thành hợp chất vị và màu sắc, và tạo thành enzym quan trọng cho việc phát triển hương vị và phân huỷ tinh bột thêm. Sau đó, mạch nha được nghiền và tạo huyền phù trong nước (“ngâm”). Hỗn hợp ngâm được gia nhiệt để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân huỷ tinh bột. Quá trình lọc sau đó tạo ra nước ủ men là dung dịch nước đã được làm trong ít nhất một lần gồm đường lên men được, dung dịch này cũng chứa các hương vị và mùi thơm khác nhau và nhiều hợp chất khác. Cả hợp chất vị và hợp chất mùi thơm mong muốn và không mong muốn đều có mặt trong nước ủ men. Hương vị “hèm” quá mức, bắt nguồn từ sự có mặt của aldehyt dư, nhìn chung được xem là không mong muốn.

Nước ủ men được đun sôi để tiệt trùng, tạo kết tủa protein và cô đặc. Hoa bia tùy

ý được bổ sung để thêm vị đắng và hương vị. Sau khi loại bỏ kết tủa, hỗn hợp này được lên men. Quá trình lên men dẫn đến sự chuyển hoá đường lên men được trong etanol và cacbon dioxit, và cũng dẫn đến sự tạo thành các hợp chất hương vị mới khác nhau, trong đó có este. Đồng thời, quá trình lên men bia loại bỏ hầu hết aldehyt, nhờ đó ngăn điều vị hèm của bia tạo thành. Sau khi lên men, bia có thể được lọc và/hoặc được lưu giữ để tối ưu hoá hình thức và vị.

Các lo ngại sức khỏe và nhận thức gia tăng về an toàn giao thông liên quan đến hàm lượng cồn trong bia đã làm tăng sự quan tâm về bia có hàm lượng cồn thấp hoặc thậm chí hàm lượng cồn bằng không. Hiện tại có hai kỹ thuật chính để tạo ra bia có hàm lượng cồn thấp hoặc hàm lượng cồn bằng không: khử cồn bia (chứa cồn) thông thường, và tạo ra bia theo quy trình mà hạn chế quá trình tạo rượu bằng phương pháp lên men thích ứng (“lên men rượu hạn chế”).

Quá trình khử cồn bia được thực hiện lên bia được ủ thường xuyên, và được thiết kế để loại bỏ etanol, nhưng càng ít thành phần hương vị khác càng tốt. sự khử cồn có thể đạt được, ví dụ, bằng cách tinh cất, thẩm thấu ngược hoặc thẩm tách bia thông thường. Tuy nhiên, sẽ hạn chế trong việc ngăn mất đi hương vị khi khử cồn bia. Do đó, nhược điểm của bia khử cồn là hương vị nhạt, có thể được sửa bằng cách bổ sung hợp chất hương vị (vị và mùi) để thu được bia có thể chấp nhận được. Tuy nhiên, vì hương vị phức tạp do có nhiều hợp chất khác nhau cùng chịu trách nhiệm đem lại hương vị, bia được khử cồn và sau đó được thêm hương vị nhìn chung được xem là khó hợp vị hơn vị của bia thông thường.

Bia có độ cồn thấp hoặc không cồn cũng có thể được tạo ra bằng cách lên men rượu hạn chế. Lên men rượu hạn chế là quy trình mà nhờ đó nước ủ men được lên men trong điều kiện hầu như không tạo thành hoặc không tạo thành etanol (hoặc ít nhất là có quy trình lên men hoàn toàn dẫn đến việc hầu như không tạo thành hoặc không tạo thành rượu thực).

Một quy trình quan trọng là lên men tiếp xúc lạnh. Khi nước ủ men được lên men ở nhiệt độ thấp, nấm men gần như không tạo ra rượu, mặc dù nó có tạo ra một số thành phần hương vị như este, mặc dù lượng mỗi este có thể khác với lượng thu được từ quá trình lên men thông thường. Do vậy, việc sửa hương vị bằng cách bổ sung hương vị và mùi thơm thường là cần thiết cả với bia được hạn chế lên men. Bia này thường được

xem là khó hợp vị hơn bia thông thường.

Do đó, bia có độ cồn thấp hoặc không cồn hiện có nhìn chung khó uống được. Hầu hết mọi người trở nên bão hoà vị chỉ sau một hoặc hai cốc, trái ngược với khi uống bia chứa cồn thông thường. Việc bão hoà vị và dẫn tới khó uống nhìn chung được gây ra bởi hương vị quá mạnh, được gây ra bởi hương vị hèm quá đậm đặc do mức aldehyt cao và độ ngọt quá cao. Sáng chế đề xuất bia khắc phục được các nhược điểm này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất bia có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, chứa etyl-2-methylpentanoat (EMP) với lượng bằng ít nhất 0,001 $\mu\text{g/L}$. EMP được phát hiện là thành phần đóng góp quan trọng cho hương vị bia. EMP có tác dụng che hương vị nước ủ men, và nhờ đó kìm hãm hương vị hèm. Điều này là quan trọng, cụ thể là với bia không cồn hoặc có độ cồn thấp, do bia này thường có hương vị hèm bởi sự có mặt tăng của aldehyt so với bia ủ theo cách thông thường. Ngoài ra, bia này thường được xem là kém đậm hơn và tươi mới hơn. Bởi vì lý do này, bia theo sáng chế được xem là dễ uống hơn bia không cồn hoặc có độ cồn thấp có trên thị trường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, bia được hiểu theo nghĩa rộng, tức là bia có thể chỉ loại bia bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, bia ale, bia đen (porter), bia đen nặng (stout), bia lager (lager) và bia bốc (bock). Bia tốt hơn là bia có gốc mạch nha, tức là bia được tạo ra từ quá trình lên men nước ủ men được tạo ra từ mạch nha (cùng với các loại khác). Tốt hơn nếu bia là bia lager, là bia thu được bằng quá trình lên men ở khoảng 7-15°C sử dụng nấm men lên men chìm, và sau đó được lưu trữ lạnh ở nhiệt độ thấp. Ví dụ, bia lager bao gồm pilsner. Tốt nhất nếu bia được mô tả ở đây là pilsner. Pilsner là bia lager nhạt (pale lager). Mục đích của sáng chế là đề xuất bia không cồn hoặc có độ cồn thấp có vị và khả năng uống được của bia thông thường.

Theo sáng chế, “bia không cồn hoặc có độ cồn thấp” là bia có hàm lượng etanol bằng 1,0% thể tích (“ABV”) hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn. Bia này cũng sẽ được gọi là bia NA. Do đó, bia NA là bia có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, tốt hơn là từ 0 đến 0,5% thể tích.

Sáng chế đề xuất bia NA có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, tốt hơn là từ 0 đến 0,5% thể tích, chứa etyl-2-methylpentanoat (EMP) với lượng bằng ít nhất 0,001 $\mu\text{g/L}$. Bia NA có thể thu được bằng các phương pháp đã biết thông thường.

Một phương pháp để thu được bia NA như được định nghĩa ở đây là cho bia ủ theo cách thông thường qua bước khử cồn, chẳng hạn như bước tinh cất, bước thẩm thấu ngược, bước thẩm tách hoặc bước cô đặc để loại bỏ etanol khỏi bia lên men. Các kỹ thuật này, ví dụ, được mô tả trong tài liệu Brányik et al, J. Food. Eng. 108 (2012) 493-506, hoặc trong tài liệu Mangindaan et al, Trends in Food Science&Technology 71 (2018) 36-45.

Việc khử cồn bia thông thường tạo ra bia khử cồn, một loại bia NA như được định nghĩa ở đây. Theo sáng chế, bia thông thường là bia ủ theo cách thông thường, có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 1 đến 15% thể tích, tốt hơn là từ 3 đến 9% thể tích. Tốt hơn nếu bia thông thường là bia lager thông thường. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng thu được bia thông thường, trong đó có bia lager thông thường, ví dụ, bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu The Brewers Handbook (ấn bản lần thứ hai) của Ted Goldammer (2008, Apex publishers). Theo cách khác, có thể thu được bia thông thường trên thị trường. Bia thông thường hiện tại được phát hiện là vốn đã chứa EMP, tạo thành trong quá trình lên men trong điều kiện thông thường (không hạn chế).

Việc khử cồn bia thông thường dẫn đến bia có lượng etanol thấp, mà còn dẫn đến sự loại bỏ nhiều este và các hợp chất khác chịu trách nhiệm về hương vị của bia. Bia này có thể được điều vị với chất điều vị trước khi dùng, để tạo ra hương vị cho bia khử cồn. Chất điều vị này không chứa EMP, do cho đến nay vẫn chưa nhận biết được tầm quan trọng của EMP dưới dạng thành phần trong chất điều vị bia.

Theo sáng chế, bia khử cồn là loại bia NA được ưu tiên. Theo sáng chế, tốt hơn nữa nếu bia NA là bia khử cồn thu được bằng kỹ thuật tinh cất.

Một phương pháp khác để thu được bia NA là làm bia bằng quy trình lên men hạn chế, tạo ra bia được hạn chế lên men. Bia được hạn chế lên men là một loại bia NA khác như được định nghĩa ở đây.

Bia được hạn chế lên men được định nghĩa là bia được lên men thu được bằng

quá trình lên men etanol hạn chế của nước ủ men. Sự lên men etanol hạn chế của nước ủ men là quy trình lên men không tạo ra lượng etanol thực tạo thành đáng kể, tức là sự lên men hạn chế như được định nghĩa ở đây tạo ra etanol với lượng bằng 1% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn. Bia được hạn chế lên men do đó có hàm lượng etanol bằng 1,0% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn.

Sự lên men hạn chế nước ủ men là quy trình trong đó sản phẩm thu được trực tiếp từ quá trình lên men có hàm lượng etanol bằng 1,0% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có biết về các kỹ thuật lên men hạn chế khác nhau mà không dẫn đến việc tạo ra etanol thực đáng kể. Chẳng hạn như lên kỹ thuật men etanol hạn chế của nước ủ men được đặc trưng bởi:

- nhiệt độ dưới 7°C, tốt hơn là -1-4°C, như -0,5-2,5°C, tốt hơn là trong khoảng thời gian 8-72 giờ, tốt hơn nữa là 12-48 giờ (“bia được lên men tiếp xúc lạnh”); và/hoặc

- thời gian lên men ngắn (ví dụ, ngắn hơn 2 giờ), quá trình lên men này dừng lại nhanh chóng do sự bất hoạt nhiệt độ, như bằng cách làm lạnh nhanh đến -0,5-1°C, tùy ý tiếp tục bằng quá trình thanh trùng sau đó (“bia ngừng lên men” - “arrested fermentation beer”); và/hoặc

- lên men bằng chủng nấm men mà tạo ra lượng etanol tương đối thấp trong điều kiện lên men áp dụng, chẳng hạn như chủng nấm men tạo ra ít hơn 0,2 g etanol mỗi gam đường lên men được trong nước ủ men, tốt hơn là ít hơn 0,1 g etanol mỗi gam đường lên men được. Các chủng thích hợp (ví dụ, chủng âm Crabtree) đã được biết trong lĩnh vực này, và lượng etanol được tạo ra trong các điều kiện lên men khác nhau có thể được xác định bằng các thử nghiệm thông thường (“bia được hạn chế nấm men”); và/hoặc

- quá trình lên men sử dụng chủng nấm men thứ nhất tạo ra etanol trong sự có mặt lượng vừa đủ của chủng nấm men thứ hai mà dùng etanol như *Saccharomyces rouxii*, để về cơ bản dùng tất cả etanol được tạo ra bởi chủng nấm men thứ nhất; và/hoặc

- nước ủ men có hàm lượng đường lên men được sao cho tối đa 1,0% thể tích rượu được tạo ra sau khi hoàn thành quá trình lên men. Trong trường hợp này, nước ủ men nhìn chung có hàm lượng đường lên men được thấp hơn 17,5 g/L, tốt hơn là thấp

hơn 12 g/L, tốt hơn nữa là thấp hơn 8 g/L (“bia có nước ủ men thiếu đường”).

Bia được hạn chế lên men chưa được cho qua bước khử cồn để đạt được hàm lượng etanol đã nêu bằng 1,0% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có biết về các kỹ thuật thích hợp khác nhau để khử cồn bia lên men, và chưa có kỹ thuật nào trong số các kỹ thuật này được áp dụng để đạt được hàm lượng etanol đã nêu. Tuy nhiên, bia được hạn chế lên men theo sáng chế có thể tùy ý được cho qua bước khử cồn để làm giảm hàm lượng etanol từ lượng 1,0% thể tích hoặc thấp hơn, tốt hơn là 0,5% thể tích, tốt hơn nữa là 0,2% thể tích hoặc thấp hơn đã nêu, như thu được từ quá trình lên men, xuống hàm lượng etanol giảm thấp hơn. Tuy nhiên, tốt hơn nếu bia được hạn chế lên men như được định nghĩa ở đây hoàn toàn không phải cho qua bước khử cồn chút nào.

Bước khử cồn để làm giảm thêm hàm lượng etanol của bia được hạn chế lên men từ 1,0% thể tích hoặc thấp hơn như được định nghĩa ở trên xuống lượng etanol thậm chí còn thấp hơn đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Điều này đã được mô tả ở trên, viện dẫn ví dụ đến Mangindaan et al và Brányik et al.

Bia được hạn chế lên men theo sáng chế tốt hơn là bia có nước ủ men thiếu đường, bia được hạn chế nấm men, bia ngừng lên men hoặc bia được lên men tiếp xúc lạnh. Theo một phương án, bia được hạn chế lên men là bia có nước ủ men thiếu đường. Theo một phương án khác, bia được hạn chế lên men là bia được hạn chế nấm men. Theo một phương án khác, bia được hạn chế lên men là bia ngừng lên men. Theo một phương án khác, bia được hạn chế lên men là bia được lên men tiếp xúc lạnh. Theo các phương án được ưu tiên, bia được hạn chế lên men là bia được lên men tiếp xúc lạnh. Đây là do bia lên men tiếp xúc lạnh chứa lượng hương vị hèm tương đối cao so với các loại bia được hạn chế lên men khác (xem Brányik et al, được nêu ở trên).

Phương pháp lên men tiếp xúc lạnh đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể thu được bia được lên men tiếp xúc lạnh bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này hoặc đã được mô tả ở đây. Phương pháp điển hình để thu được bia được lên men tiếp xúc lạnh, ví dụ, được mô tả trong Brányik et al, được trích dẫn ở trên. Theo cách khác, bia được lên men tiếp xúc lạnh có thể thu được trên thị trường.

Mặc dù việc lên men hạn chế có thể dẫn đến sự hình thành một số hợp chất este, lượng và loại este khác với hỗn hợp este được tìm thấy ở bia ủ theo cách thông thường. Vì lý do này nên vị khó hợp hơn, được sửa bằng cách bổ sung chất điều vị thích hợp để tạo ra hương vị mong muốn. Quá trình lên men hạn chế hiện được phát hiện là không tạo ra lượng EMP tạo thành đáng kể.

EMP được phát hiện là thành phần trong bia ủ theo cách thông thường, có vai trò quan trọng trong việc tạo ra hương vị bia. Thành phần này có mặt với lượng thấp hơn đáng kể trong bia không cồn hoặc có độ cồn thấp đã biết, do lượng tạo thành thấp trong quy trình lên men hạn chế, trong đó có quy trình tiếp xúc lạnh, và/hoặc do giảm lượng có mặt sau khi khử cồn.

Chức năng quan trọng của EMP là che hương vị nước ủ men. EMP còn tạo ra hương vị trái cây giống táo, và đem lại đặc điểm tươi mới đi kèm bia thông thường. Vì các lý do này, việc làm giàu bia NA với EMP được phát hiện là có lợi, như với lượng bằng ít nhất 0,001 $\mu\text{g/L}$ ("ppb"). Do đó, sáng chế còn mô tả việc sử dụng etyl-2-methylpentanoat để che hương vị nước ủ men và/hoặc tạo ra hương vị tươi mới.

Lượng EMP trong bia NA tốt hơn là bằng ít nhất 0,004 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là bằng ít nhất 0,01 $\mu\text{g/L}$, thậm chí tốt hơn nữa là bằng ít nhất 0,1 $\mu\text{g/L}$. Lượng EMP được ưu tiên bao gồm lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là từ 1 đến 800 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là từ 10 đến 500 $\mu\text{g/L}$. Theo các phương án được ưu tiên, lượng EMP nằm trong khoảng từ 50 đến 600 $\mu\text{g/L}$.

Tác dụng quan trọng của EMP là che hương vị hèm thường có ở bia NA, cụ thể là bia lên men tiếp xúc lạnh. Dù vậy, tốt hơn nếu bia này chứa lượng aldehyt tương đối thấp. Theo các phương án được ưu tiên, tổng lượng aldehyt trong bia, được định nghĩa là tổng lượng 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methylthiopropionaldehyt, phenylaxetaldehyt, hexanal, trans-2-nonenal, benzaldehyt và furfural, thấp hơn 600 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là thấp hơn 400 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là thấp hơn 200 $\mu\text{g/L}$, tốt nhất là thấp hơn 80 $\mu\text{g/L}$. Theo các phương án được ưu tiên khác, tổng lượng aldehyt Strecker (được định nghĩa là tổng lượng 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methylthiopropionaldehyt và phenylaxetaldehyt) là thấp hơn 200 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là thấp hơn 150 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là thấp hơn 100 $\mu\text{g/L}$, tốt nhất là thấp hơn 50 $\mu\text{g/L}$. Lượng EMP trong bia NA với lượng aldehyt này là bằng ít nhất 0,001 $\mu\text{g/L}$, tốt

hơn là bằng ít nhất 0,004 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là bằng ít nhất 0,01 $\mu\text{g/L}$, thậm chí tốt hơn nữa là bằng ít nhất 0,1 $\mu\text{g/L}$, như nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là từ 1 đến 800 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là từ 10 đến 500 $\mu\text{g/L}$. Theo các phương án được ưu tiên, lượng EMP nằm trong khoảng từ 50 đến 600 $\mu\text{g/L}$. Ưu tiên khi aldehyt có mặt với lượng cao hơn thì lượng EMP cũng cao hơn.

Ưu tiên nếu bia không cồn hoặc có độ cồn thấp không quá ngọt, bởi điều này sẽ cải thiện khả năng uống được. Tổng hàm lượng đường của bia NA thu được, được định nghĩa là toàn bộ lượng glucoza, fructoza, sucroza, maltoza và maltotrioza, tốt hơn là bằng ít nhất 0,2 g/100 mL. Ưu tiên nếu tổng hàm lượng đường tương đối thấp, như bằng nhiều nhất 3 g/100 mL, tốt hơn là nhiều nhất 2 g/100 mL. Theo các phương án được ưu tiên, tổng hàm lượng đường nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0 g/100 mL, tốt hơn là từ 1,2 đến 2,0 g/100 mL.

Tốt hơn nếu bia thu được chứa maltotrioza với lượng bằng ít nhất 0,2 g/100 mL. Bia này còn tốt hơn nếu chứa glucoza với lượng bằng ít nhất 0,05 g/100 mL và/hoặc fructoza với lượng bằng ít nhất 0,05 g/100 mL. Ưu tiên nếu tổng hàm lượng đường của bia thu được bao gồm maltoza với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 100% khối lượng, tốt hơn là từ 50 đến 80% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 50 đến 65% khối lượng. Hàm lượng maltoza của bia thành phẩm tốt hơn là bằng ít nhất 0,5 g/100 mL.

Bia được ưu tiên thu được bằng phương pháp theo sáng chế còn chứa amino nitơ tự do (FAN) với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 250 mg/L, tốt hơn nữa là từ 50 đến 200 mg/L, tốt hơn nữa là từ 75 đến 150 mg/L. Amino nitơ tự do, như được sử dụng ở đây, chỉ tổng lượng hợp chất amino tự do như được xác định bằng phương pháp NOPA. Phương pháp này thu được kết quả định lượng các hợp chất amino bậc một, như axit amin tự do, peptit nhỏ và amoniac. Lượng FAN được nêu là khía cạnh quan trọng của vị và màu sắc của bia thành phẩm.

Bia được ưu tiên thu được bằng phương pháp theo sáng chế còn chứa axetaldehyt với lượng thấp hơn 5 mg/L, tốt hơn là thấp hơn 3 mg/L. Điều này là quan trọng với profin hương vị của bia thu được.

Tốt hơn nếu bia theo sáng chế cũng chứa etyl propanoat với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là từ 1,5 đến 5 $\mu\text{g/L}$, là thành phần quan trọng tạo ra vị. Tốt hơn nữa nếu bia theo sáng chế chứa etyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ

0,05 đến 30 mg/L, tốt hơn là từ 0,1 đến 15 mg/L. Điều này cũng quan trọng trong việc tạo ra vị. Tốt hơn nếu bia thu được từ quá trình chưng cất còn chứa isoamyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 7.5 mg/L, tốt hơn là từ 0,08 đến 4.5 mg/L, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 1 mg/L.

Các ưu điểm của bia theo sáng chế bao gồm đặc tính hương vị được cải thiện, trong đó có độ ngọt giảm và hương vị hèm giảm. Điều này dẫn đến một số hương vị khác ít áp đảo hơn. Bia theo sáng chế có độ ngọt thấp và mức aldehyt tốt thậm chí so với độ ngọt giảm bớt này. Điều này mang lại kết quả là ở độ ngọt và cường độ vị thấp hơn, bia không được xem là có mùi hèm, và người tiêu thụ không trở nên bão hoà vị chỉ sau một vài cốc bia. Ngoài ra, bia này thường được xem là kém đậm hơn và tươi mới hơn. Do đó, bia theo sáng chế dễ uống hơn so với bia không còn hiện có.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra bia có hàm lượng cồn nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, tốt hơn là từ 0 đến 0,5% thể tích, bao gồm bước kết hợp bia không cồn hoặc có độ cồn thấp như được định nghĩa ở trên với etyl-2-methylpentanoat. Theo một phương án, EMP có thể được kết hợp với bia NA bằng cách thêm làm chất điều vị. Theo các phương án này, EMP có thể thu được trên thị trường, và/hoặc có thể thu được bằng cách phân lập từ nguồn tự nhiên, như phân lập từ bia ủ theo cách thông thường. Do đó, theo các phương án được ưu tiên, việc kết hợp với etyl-2-methylpentanoat đạt được bằng cách kết hợp với chất điều vị chứa etyl-2-methylpentanoat.

Theo một phương án, chất điều vị là chất điều vị chứa etyl-2-methylpentanoat. Theo phương án này, chất điều vị có thể chứa hỗn hợp hương vị được thiết kế để đạt được lượng este cụ thể trong bia thành phẩm. Chất điều vị cũng có thể chứa các hợp chất hương vị và mùi thơm khác, như axit (hữu cơ), dialdehyt, rượu bậc cao, muối và các hợp chất tương tự.

Theo các phương án khác, chất điều vị có thể là bia thông thường, tốt hơn là bia lager thông thường, tốt nhất là pilsner. Ưu điểm của việc sử dụng bia thông thường làm chất điều vị là việc bia thông thường chứa hỗn hợp hương vị và mùi thơm được cho là tự nhiên bởi người tiêu thụ bia, tạo ra bia NA có profin hương vị và mùi thơm giống bia thông thường.

Theo một số phương án, chất điều vị bia thông thường có thể là chất điều vị có nguồn gốc từ bia thông thường nhờ cô đặc, như loại bỏ cồn và/hoặc nước một phần hoặc

toàn bộ để thu được sản phẩm cô đặc bia thông thường có thể ở dạng rắn hoặc lỏng. Các kỹ thuật thích hợp để thu được sản phẩm cô đặc bia này, ví dụ, là đông khô và cô đặc kết đông, mặc dù người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể nghĩ ra nhiều cách để thu được sản phẩm cô đặc bia thích hợp bằng cách sử dụng kiến thức thông thường.

Theo một phương án, chất điều vị là bia thông thường, tốt hơn là bia lager thông thường. Tốt hơn nếu theo phương án này, phương pháp này bao gồm bước trộn bia được hạn chế lên men, tốt hơn là bia lên men tiếp xúc lạnh, với bia thông thường, tốt hơn là bia lager thông thường. Ưu tiên nếu bia được hạn chế lên men và bia thông thường được trộn theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 1:99 đến 99:1, tốt hơn là từ 5:95 đến 50:50.

Theo một số phương án, theo sau bước trộn là bước chưng cất chân không, như để loại bỏ aldehyt dư thu được từ bia được hạn chế lên men. Theo các phương án này, có thể sẽ có lợi nếu thêm chất điều vị khác, ví dụ, chất điều vị chứa hỗn hợp hương vị như được định nghĩa ở trên, sau bước chưng cất đã nêu để đạt được profin hương vị mong muốn.

Nhằm mục đích làm rõ và mô tả ngắn gọn, các dấu hiệu được mô tả ở đây như là một phần của các phương án giống nhau hoặc riêng biệt, tuy nhiên, sẽ phải thừa nhận rằng phạm vi của sáng chế có thể bao gồm các phương án có tổ hợp của tất cả hoặc một số dấu hiệu đã mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa tiếp bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Phương pháp

Xác định aldehyt trong bia bằng cách sử dụng kỹ thuật vi chiết pha rắn tạo dẫn xuất trên sợi và kỹ thuật sắc ký khí - phổ khối

Điều chế mẫu

Trong môi trường khí CO₂, 30,0 g mẫu bia được cân trong lọ 40 mL. Bằng xylanh kín khí 50 µL, 30 µL dung dịch nội chuẩn được thêm vào mỗi mẫu. Tiếp theo, vẫn trong điều kiện khí CO₂, hai lọ có không gian trên (headspace) 10 mL được làm đầy với 4,0 g mẫu. Do đó, mẫu bia được phân tích hai lần lặp lại.

Quy trình tạo dẫn xuất

Dung dịch gốc gồm xấp xỉ 200 mg/L O-(2,3,4,5,6-pentaflorobenzyl)-hydroxylamin (PFBHA) trong nước khử ion được chuẩn bị. Lọ thủy tinh trong suốt có nắp gấp 20 mL tiêu chuẩn được làm đầy với 14 g dung dịch PFBHA. Tiếp theo, sợi SPME (Supelco) được đặt trong không gian trên của lọ tạo dẫn xuất trong 10 phút ở 30°C để thấm pha PDMS/DVB của sợi SPME với chất tạo dẫn xuất. Sợi SPME được thấm PFBHA sau đó được đặt trong không gian trên của mẫu bia (4,0 g trong lọ 10 mL, được làm đầy trong môi trường khí CO₂), tạo ra các dẫn xuất PFBHA của aldehyt được quan tâm. Điều kiện chiết xuất được chọn là 30 phút ở 30°C.

Điều kiện GC

Sắc ký khí Agilent 7890A, được trang bị cửa nạp chia/không chia, được sử dụng cho phương pháp này. Việc phân tách tối ưu các hợp chất PFBHA/aldehyt đạt được bằng cột VF17MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent). Một số hợp chất rửa giải đồng thời, nhưng trong các trường hợp này tính chọn lọc của MS có thể tránh khả năng phải phân tách sắc ký. Ví dụ, trans-2-nonenal, phenyl-axetaldehyt và decanal đều rửa giải đồng thời, nhưng thiết bị đo phổ khối nhắm đích vào các ion chọn lọc với mỗi hợp chất.

Heli có tốc độ 1 mL/phút được sử dụng làm khí mang. Tỷ lệ chia bằng 5 được sử dụng để tối ưu hoá độ rộng và độ nhạy pic. Lò được lập trình ở 50°C (2 phút) với tốc độ tăng 10°C/phút lên đến 230°C, sau đó là tăng 30°C/phút lên đến 290°C (giữ 2 phút).

Điều kiện MS

Agilent 5975C MSD được thiết lập cho quá trình ion hoá hoá âm (NCI: negative chemical ionization).

Với tất cả các aldehyt được nhắm đích theo phương pháp này, mảnh ion thích hợp được chọn. Trong hầu hết các trường hợp, mảnh cụ thể của hợp chất được chọn thay vì đoạn có nhiều nhất. Điều này cho phép xác định chọn lọc các hợp chất đích được quan tâm. Trong hầu hết các trường hợp, Mw ion phân tử trừ đi m/z 20 (mất đi H-F) là thích hợp nhất.

Do hầu hết hợp chất aldehyt PFBHA bao gồm hai pic (syn và anti), nên diện tích các pic này được cộng lại. Có thể định lượng tất cả các hợp chất aldehyt bằng cách thiết lập đường cong định chuẩn thích hợp dựa trên việc bổ sung tiêu chuẩn vào bia Heineken. Xác định các hợp chất este và rượu trong bia bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết hấp thụ

trên thanh khuấy và kỹ thuật sắc ký khí - phối khổ

Do khoảng nồng độ lớn của chất phân tích, các mẫu phải được phân tích hai lần bằng các phương pháp GC-MS khác nhau; một phương pháp dùng cho việc xác định hợp chất nồng độ cao, và một phương pháp dùng cho hợp chất nồng độ thấp. Sự khác nhau giữa hai phương pháp này là chế độ hoạt động của máy dò chọn lọc khối. Iso-amyl axetat được xác định bằng cách sử dụng phương pháp nồng độ cao, và etyl axetat được xác định bằng cách sử dụng phương pháp nồng độ thấp.

Điều chế mẫu

30,0 g mẫu bia được cân trong lọ 40 mL hai lần lặp lại. Bằng xylanh kín khí 50 μ L, 30 μ L dung dịch nội chuẩn được thêm vào mỗi mẫu. Tiếp theo, ống xoắn sạch và đã thiết lập trước được thêm vào mỗi mẫu. Đĩa khuấy 60 vị trí được sử dụng để chiết tách các mẫu. Thời gian chiết tách là một giờ. Để ngăn ngừa sự tạo thành các hợp chất bị cảm ứng bởi ánh sáng, các mẫu được che phủ tránh ánh sáng.

Điều kiện thiết bị

Sắc ký khí Agilent 7890B được nối với Agilent 5977A MSD. Quá trình đưa mẫu vào được thực hiện bởi robot Gerstel MPS2-XT, kết hợp với bộ giải hấp nhiệt TDU-2 và cửa nạp nhiệt độ có kiểm soát CIS-4 (cả hai đều từ Gerstel). Cột mao quản chính là 50m x 0,25mm x 0,25 μ m DB-5MS UI. Heli có tốc độ 1,5 mL/phút được sử dụng cho khí mang. Quá trình giải hấp nhiệt của ống xoắn được thực hiện trong chế độ thông hơi dung môi, giữ các chất rửa giải ở -20°C trên lớp lót chứa đầy tenax. Trong bước gia nhiệt, bơm được chuyển sang tỷ lệ chia 100:1 và 6:1 cho phương pháp nồng độ cao và thấp tương ứng. Lò được lập trình ở 40°C (2 phút) với tốc độ tăng 10°C/phút lên đến 280°C (giữ 1 phút). MSD được thiết lập cho chế độ quét (33-300 m/z) theo phương pháp nồng độ cao, và trong chế độ ion đơn cho phương pháp nồng độ thấp.

Có thể định lượng tất cả các hợp chất bằng cách tạo đường cong định chuẩn (bổ sung tiêu chuẩn vào bia nền (matrix beer) thích hợp). Toàn bộ các định chuẩn được thực hiện trong cả đồ uống chứa cồn và chứa 0,0% cồn.

Xác định hàm lượng đường trong nước ủ men, bia và nước táo lên men

Hàm lượng đường được đo bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC). UPLC có thể được thực hiện thích hợp ở nhiệt độ 65°C. Lựa chọn thích hợp với chất rửa giải là

hỗn hợp axetonitril/nước, ví dụ, theo tỷ lệ thể tích 75/25. Máy dò được sử dụng thường là máy dò chỉ số khúc xạ (RI: Refractive Index). Hàm lượng đường của mẫu được xác định bằng cách so sánh đường cong UPLC của mẫu với đường cong định chuẩn của mẫu tiêu chuẩn có nồng độ đường đã biết.

Các mẫu dùng cho UPLC được điều chế như sau. Mẫu bia hoặc nước ủ men được pha loãng theo hệ số 5 bằng cách bổ sung hỗn hợp axetonitril/nước (50/50 – các phần thể tích bằng nhau). CO₂, nếu có, được loại bỏ trước khi pha loãng (ví dụ, bằng cách lắc hoặc khuấy mẫu). Sau khi pha loãng, mẫu được lọc để thu được dung dịch trong. Mẫu đã lọc được bơm vào UPLC ở 65°C sử dụng chất rửa giải được đề cập ở trên.

Xác định amino nitơ tự do (FAN)

Lượng amino nitơ tự do được đo theo phương pháp thử nghiệm nitơ bằng O-Phthaldialdehyt (NOPA: Nitrogen by O-Phthaldialdehyde Assay). Phương pháp NOPA được thực hiện bằng cách sử dụng máy phân tích trắc quang (ví dụ, Gallery™ Plus Photometric Analyzer). Theo phương pháp NOPA, mẫu thử nghiệm được xử lý bằng ortho-phthaldialdehyt (OPA) và N-acetylxystein (NAC). Việc xử lý này sẽ dẫn đến quá trình tạo dẫn xuất các nhóm amino bậc một có mặt trong mẫu thử nghiệm khi tạo thành isoindol. Hàm lượng isoindol sau đó được xác định bằng cách sử dụng máy phân tích trắc quang ở bước sóng 340 nm. Amino nitơ tự do (được biểu diễn bằng mg FAN/L) sau đó có thể được tính dựa trên hàm lượng đo được của isoindol. Nếu cần thiết, mẫu bia hoặc nước ủ men trước tiên phải được cho qua bước quay ly tâm để làm rõ mẫu và/hoặc loại bỏ CO₂ (ví dụ, bằng cách khuấy hoặc lắc mẫu) trước khi phân tích.

Xác định etanol trong bia

Hàm lượng etanol được đo bằng cách sử dụng máy phân tích trắc quang (ví dụ, Gallery™ Plus Photometric Analyzer). Mẫu thử nghiệm được thực hiện phương pháp enzym trong đó etanol có mặt trong mẫu được chuyển hoá thành axetaldehyt bằng rượu dehydrogenaza (ADH). Hàm lượng axetaldehyt sau đó được xác định bằng cách sử dụng máy phân tích trắc quang ở bước sóng 340 nm. Hàm lượng etanol có thể được tính dựa trên hàm lượng axetaldehyt. Nếu cần thiết, mẫu bia hoặc nước ủ men trước tiên phải được cho qua bước quay ly tâm để làm sạch mẫu và/hoặc loại bỏ CO₂ (ví dụ, bằng cách khuấy hoặc lắc) trước khi phân tích.

Ví dụ 1

Tác dụng của ethyl-2-methylpentanoat làm chất che hương vị nước ủ men và tạo ra hương vị bia trái cây tươi mới.

Bia không còn được tạo ra bằng cách tinh cất. Bia trống không (blank beer) có lượng hương vị như este tương đối thấp. Với bia trống không, ethyl-2-methylpentanoat (EMP) được thêm vào làm chất điều vị ở nồng độ 50 ppb. Không có sự khác biệt nào khác giữa bia trống không và bia pha (spiked beer). Khác biệt về cảm nhận giữa bia trống không và bia pha EMP được chỉ ra bởi nhóm đánh giá cảm nhận lạnh nghề gồm 17 người. Nhóm đánh giá cảm nhận đã chỉ ra các thuộc tính hương vị gây khác biệt giữa hai loại bia. Số lượng người tham gia đánh giá chỉ ra sự có mặt nhiều thuộc tính hương vị hơn được thể hiện trong Bảng 1.

Từ các kết quả này, có thể thấy rằng EMP có tác dụng che hương vị nước ủ men đặc biệt mạnh. Hương vị nước ủ men (có nguồn gốc từ aldehyt) được xem là có nhiều ở bia trống không bởi 16 trong số 17 người tham gia. Ở bia trống không được pha với EMP 50 µg/L, hương vị nước ủ men bị kìm hãm. Do đó, EMP 50 µg/L kìm hãm mạnh mẽ hương vị nước ủ men.

Ngoài ra, sự có mặt của EMP tạo ra hương vị giống axit, trái cây và cam quýt. Do đó, bia pha được xem là tươi mới hơn.

Bảng 1	Bia trống không	Bia trống không + EMP 50 µg/L
Đắng	5	6
Ngọt	8	4
Axit	3	7
Nhìn chung có vị trái cây	0	16
Cam quýt/tươi mới	0	11
Nước ủ men	16	0
Kim loại	10	2
Lưu huỳnh	12	0
Se chất	5	0
Axit isovaleric	1	7
Diethyl	0	2
Giống thảo mộc	4	0
Hần dẫn	1	0
Mỏng	0	1

Ví dụ 2

Tác dụng của ethyl-2-methylpentanoat làm chất che hương vị nước ủ men và tạo ra hương vị bia trái cây tươi mới ở bia có hương vị đầy đủ.

Bia không còn thu được bằng kỹ thuật chưng cất chân không hỗn hợp bia thông thường và bia lên men tiếp xúc lạnh, và được điều vị đầy đủ để tạo ra vị bia bằng cách sử dụng hỗn hợp hương vị KHÔNG chứa EMP, được pha với lượng EMP tăng dần (1, 50, 250, 500 và 1000 ppb EMP). Nhóm đánh giá vị gồm 17 chuyên gia vị giác lành nghề cho điểm về cường độ nhận biết với 3 thuộc tính hương vị: hương vị nước ủ men bia, trái cây và táo. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 1.

Kết quả cho thấy việc tăng lượng EMP trong bia không còn hoặc có độ còn thấp che tăng hương vị nước ủ men nhiều dần, và làm tăng hương vị trái cây. Trong trường hợp hỗn hợp hương vị, EMP tạo ra hương vị giống táo, và đem lại tác dụng tươi mới mạnh.

Ví dụ 3

So sánh bia thu được với các loại bia không còn hoặc có độ còn thấp trên thị trường

Bia thu được bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế được so sánh với bia không còn hiện có bởi nhóm đánh giá vị gồm 17 người tham gia lành nghề. Bia được đánh giá về các thuộc tính hương vị cụ thể, bao gồm độ ngọt, hương vị nước ủ men và tổng cường độ hương vị, cũng như các tầng hương vị khác. Với mỗi thuộc tính, cường độ nhận biết được chỉ ra trên thang chia vạch. Toàn bộ những người tham gia đánh giá tất cả các loại bia về tất cả các thuộc tính, và kết quả được tính trung bình. Các kết quả được đưa ra trong Bảng 2.

Bia thu được bằng phương pháp theo sáng chế có hương vị hèm yếu hơn và vị ngọt ít hơn so với bia không còn có trên thị trường. Do đó, khả năng mà người tiêu thụ trở nên bão hoà vị chỉ trong vài cốc bia là thấp hơn, bởi vị không áp đảo bằng. Ngoài ra, bia này thường được xem là kém đậm hơn và tươi mới hơn. Vì lý do này, bia theo sáng chế được xem là dễ uống hơn bia không còn hiện có trên thị trường.

Bảng 2	Bia theo sáng chế	Bia thương mại A	Bia thương mại B	Bia thương mại C	Bia thương mại D	Bia thương mại E
Vị ngọt	18	28	26	23	23	17
Hương vị nước ủ men	27	39	42	28	33	38
Hương vị trái cây/este	31	17	18	33	20	16
>Hương vị kẹo hạt lê (peardrop)	29	14	12	21	15	12
>Hương vị trái cây nhiệt đới	9	5	7	19	2	1
>Hương vị táo xanh	11	2	4	5	2	3
Hương vị hoa bia	14	10	8	24	11	17
Hương vị giấm	2	1	0	5	1	10
Tổng cường độ	40	44	45	46	43	47
Cảm nhận tươi mới trong miệng	42	33	35	32	37	36
Cảm nhận trong miệng về độ đậm	27	32	32	29	28	29
Cảm nhận ẩm lên trong miệng	5	5	2	5	5	3
Dư vị ngọt	18	25	25	23	23	15

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bia có hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, chứa etyl-2-methylpentanoat (EMP) với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 $\mu\text{g/L}$.
2. Bia theo điểm 1, trong đó lượng EMP nằm trong khoảng từ 1 đến 800 $\mu\text{g/L}$.
3. Bia theo điểm 1 hoặc 2, trong đó tổng lượng aldehyt, được định nghĩa là tổng lượng 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methylthiopropionaldehyt, phenylaxetaldehyt, hexanal, trans-2-nonenal, benzaldehyt và furfural thấp hơn 600 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là thấp hơn 400 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là thấp hơn 200 $\mu\text{g/L}$, tốt nhất là thấp hơn 80 $\mu\text{g/L}$.
4. Bia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tổng lượng aldehyt Strecker, được định nghĩa là tổng lượng 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methylthiopropionaldehyt và phenylaxetaldehyt, thấp hơn 200 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là thấp hơn 150 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn nữa là thấp hơn 100 $\mu\text{g/L}$, tốt nhất là thấp hơn 50 $\mu\text{g/L}$.
5. Bia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tổng hàm lượng đường, được định nghĩa là tổng lượng glucoza, fructoza, sucroza, maltoza và maltotrioza, bằng ít nhất 0,2 g/100 mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0 g/100 mL.
6. Bia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hàm lượng đường bao gồm maltoza với lượng bằng ít nhất 50% khối lượng.
7. Bia theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó bia này còn chứa etyl propanoat với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 $\mu\text{g/L}$, tốt hơn là từ 1,5 đến 5 $\mu\text{g/L}$, và/hoặc etyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 30 mg/L, tốt hơn là etyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 15 mg/L.
8. Phương pháp tạo ra bia có hàm lượng cồn nằm trong khoảng từ 0 đến 1,0% thể tích, phương pháp này bao gồm bước kết hợp bia không cồn hoặc có độ cồn thấp với etyl-2-methylpentanoat đến nồng độ cuối của bia này trong khoảng từ 1 đến 1000 $\mu\text{g/L}$.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước kết hợp với etyl-2-methylpentanoat đạt được bằng cách kết hợp với chất điều vị chứa etyl-2-methylpentanoat.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chất điều vị là hỗn hợp hương vị chứa etyl-

2-methylpentanoat.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chất điều vị là bia thông thường, tốt hơn là bia lager thông thường.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn bia được hạn chế lên men, tốt hơn là bia lên men tiếp xúc lạnh với bia thông thường, tốt hơn là bia lager.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bia được hạn chế lên men và bia thông thường được trộn theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 1:99 đến 99:1, tốt hơn là từ 5:95 đến 50:50.
14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó theo sau bước trộn là bước chưng cất chân không, và tùy ý bổ sung thêm etyl-2-methylpentanoat.

1/1

Fig.1

