



(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)



1-0053849

(51)^{2020.01} A23L 2/70; C12R 1/84; A23L 2/84

(13) B

(21) 1-2021-00429

(22) 23/07/2019

(86) PCT/EP2019/069780 23/07/2019

(87) WO2020/035268 20/02/2020

(30) 18188644.1 13/08/2018 EP

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/07/2021 400A

(73) CHR. HANSEN A/S (DK)

Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark

(72) SAERENS, Sofie (BE); SWIEGERS, Jan Hendrik (AU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM VỊ LẠ CỦA ĐẤT TRONG NƯỚC ÉP RAU CỦ, NƯỚC ÉP RAU CỦ ĐÃ ĐƯỢC LÊN MEN THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY, CHỦNG PICHIA KLUYVERI, NƯỚC ÉP RAU CỦ ĐÃ ĐƯỢC LÊN MEN BAO GỒM RAU CỦ VÀ PICHIA KLUYVERI VÀ CHẾ PHẨM CHO QUÁ TRÌNH LÊN MEN

(21) 1-2021-00429

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra nước ép rau củ bao gồm bước lên men cơ chất rau củ quả bằng *Pichia kluyveri*. Nước ép rau củ đã được lên men thu được bằng phương pháp này có đặc tính hương vị tốt hơn, đặt biệt là làm giảm hương vị đất. Sáng chế cũng đề cập đến chủng *Pichia kluyveri* hữu ích dùng để lên men cơ chất rau củ quả, mà có thể được xử lý tiếp để thu được đồ uống hoặc các sản phẩm tiêu dùng khác.

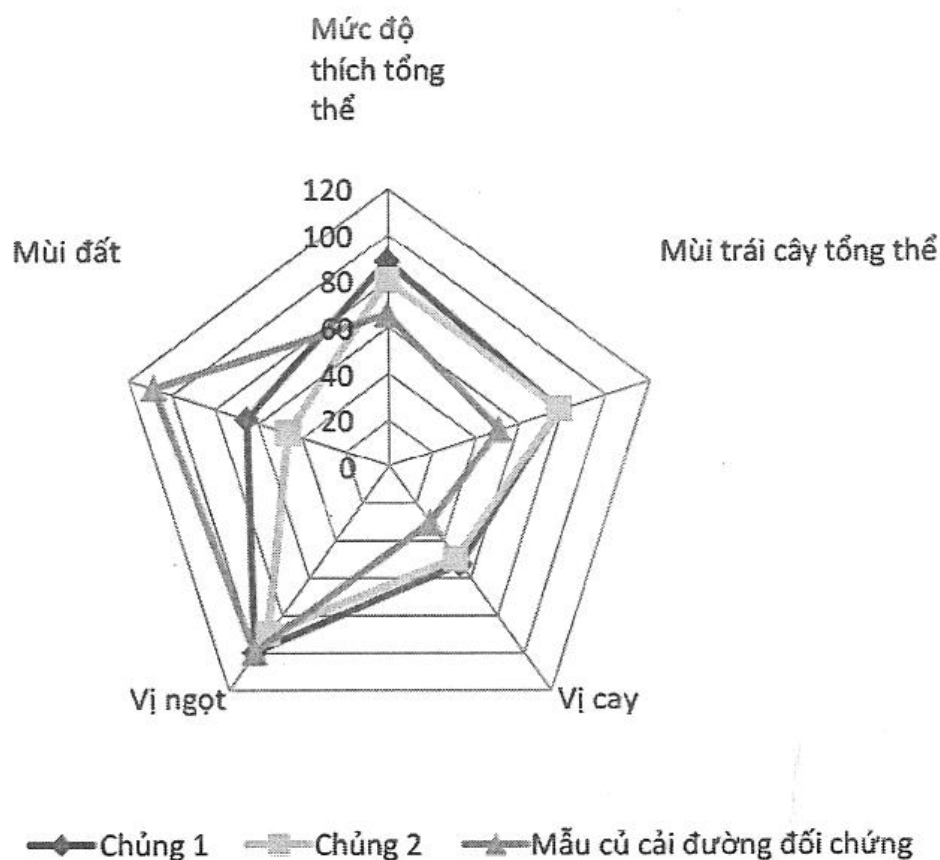


FIG 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra đồ uống có độ cồn thấp hoặc đồ uống không cồn có nguồn gốc từ thực vật, và cụ thể hơn là phương pháp tạo ra nước ép rau củ. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng vi sinh vật để tạo ra đồ uống như vậy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rau củ là nguồn thực phẩm quý giá cung cấp các chất dinh dưỡng quan trọng cần thiết cho cơ thể con người. Chế độ ăn trên cơ sở nước ép rau củ đã trở nên ngày càng phổ biến. Nước ép rau củ được xem là một thay thế lành mạnh cho nước ép trái cây vì nó chứa ít đường hơn. Tuy nhiên, vấn đề với nước ép rau củ là hương vị không phải lúc nào cũng hấp dẫn. Hương vị của nước ép rau củ tươi có thể có mùi đất (như trong nước ép củ cải đường, cà rốt và cải bắp) hoặc mùi sulfuric (như trong nước ép tỏi tây và hành), đó là lý do chính tại sao nước ép rau củ gần như không ngon miệng như nước ép trái cây. Đó là một thách thức liên tục để tạo ra nước ép rau củ được nhiều người tiêu dùng chấp nhận liên quan đến việc cân bằng hương vị, mùi thơm, vẻ bề ngoài và cảm giác ngon miệng.

Ngoài ra, khi nước ép rau củ được xử lý bằng nhiệt để bảo quản lâu dài bằng phương pháp thanh trùng, nhiều hương vị khác được tạo ra hoặc tăng cường trong quá trình này. Một số loại không có mùi vị được mô tả là rau củ nấu chín, không hấp dẫn đối với người tiêu dùng. Để giải quyết vấn đề này, ngành công nghiệp nước ép thường trộn nước ép rau củ với nước ép trái cây.

Quá trình lên men đã được sử dụng để cải thiện hương vị của đồ uống. Corona et al. (Corona, Onofrio, et al. "Characterization of kefir-like đồ uống produced from nước ép rau củ." LWT-Food Science and Technology 66 (2016): 572-581) mô tả phương pháp lên men nước ép rau củ và trái cây với môi trường

nuôi cấy kefir chứa cả vi khuẩn axit lactic lẫn *Saccharomyces cerevisiae*. Vi khuẩn axit lactic gồm *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, và *Lactobacillus fermentum*. Nước ép rau củ và trái cây lên men được phân tích cảm quan từ 15 người tham gia cảm quan chưa qua đào tạo. Loại nước ép trái cây duy nhất có hương vị hấp dẫn đồ uống từ cà rốt giống rượu kefir. Tuy nhiên, đồ uống từ cà rốt giống rượu kefir có nồng độ cồn cao hơn 3% là điều không mong muốn đối với loại đồ uống có lợi cho sức khỏe.

CN108244425 bộc lộ đồ uống chức năng được tạo ra bằng cách lên men nước ép củ cải đường (*Beta vulgaris*) bằng vi khuẩn axit lactic và phối trộn với nước ép cà chua. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus fermentum* được sử dụng để lên men nước ép củ cải đường. Các thành phần khác bao gồm chiết phẩm chanh, chiết phẩm bạc hà, chiết phẩm thì là, mật ong và isomaltooligosaccarit được bổ sung vào để tạo hương thơm và hương vị sáng khoái.

WO2012066176 mô tả quá trình tạo ra nước cam lên men có cồn bằng cách sử dụng chủng *Pichia kluyveri* được nộp lưu với số lưu giữ CECT 13055. Chủng này có thể lên men đường khử có trong nước ép cam, dẫn đến thành phẩm chứa đường không khử, như sucroza, và từ đó tạo ra sản phẩm có thị hiếu dễ chịu. Ngoài ra, thành phẩm thường có nồng độ cồn khoảng 2,5%.

WO2011134952 mô tả việc cấy *Pichia kluyveri* vào nước ép nho. Nấm men được bổ sung ở dạng đông lạnh được rã đông thành dạng lỏng trước khi bổ sung môi trường. Đã phát hiện ra rằng nấm men đông lạnh có thể được sử dụng để cấy trực tiếp mà không làm giảm đáng kể số lượng tế bào và hoạt động sau đó. Tài liệu tham khảo không mô tả bất kỳ sự cải thiện nào về hương vị của đồ uống.

US20170258113 mô tả phương pháp tạo ra nước hoa quả dâu tây đỏ lên men bằng cách sử dụng *Pichia kluyveri* XT110. Như đã nêu, *Pichia kluyveri* XT110 có thể lên men ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 to 3,0, điều này là quan trọng để giữ cho anthoxyanin ổn định và do đó không gây ra sự phai màu nghiêm trọng của thành phẩm. Nước ép lên men từ quả dâu tây đỏ được chế biến có màu sắc tươi sáng, hàm lượng anthoxyanin cao, hương vị trái cây phong phú và hương vị cân bằng, và hàm lượng cồn thấp (<0,5%).

WO2015117978 mô tả việc sử dụng hai chủng *Pichia kluyveri* PK-KR1 và PK-KR2 để tạo ra rượu táo từ nước ép táo và/hoặc lê. Sản phẩm được phát hiện có chứa lượng tăng của hexyl axetat và các hợp chất có hương vị mong muốn khác, đặc biệt là hexyl axetat và isobutyl axetat. Hai chủng *Pichia kluyveri* PK-KR1 và PK-KR2 được bộc lộ ban đầu trong WO2009110807, trong đó đã mô tả rằng chúng có thể được sử dụng để làm tăng mức thiol (3MH và 3MHA) trong quy trình lên men rượu. 3MH và 3MHA có hương thơm và vị giống bưởi và chanh dây khác biệt. PK-KR1 và PK-KR2 cũng được sử dụng với các giống hoa bia khác nhau để ủ bia (WO2013030398) cũng như bia có độ cồn thấp hoặc bia không cồn (WO2014135673).

Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có giải pháp để tăng hương vị của nước ép rau củ. Cần có các phương pháp mới để tạo ra nước ép rau củ với đặc tính hương vị mong muốn như làm giảm các vị lạ không mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp mới tạo ra nước ép rau củ có hương vị tăng cường. Đã khám phá ra rằng *Pichia kluyveri* có thể được sử dụng có lợi để lên men nước ép rau củ để thu được sản phẩm có đặc tính hương vị cải thiện và do đó tạo cảm giác dễ chịu.

Như đã đề cập trên đây, ngược với nước ép trái cây, đặc tính hương vị của nước ép rau củ không phải lúc nào cũng hấp dẫn. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp khác để cải thiện hương vị của nó mà không cần kỹ thuật cơ học hoặc trộn nước ép trái cây.

Chi tiết hơn, đã phát hiện ra rằng *Pichia kluyveri* có thể được sử dụng để tạo ra hợp chất tạo hương vị với mức tăng bao gồm isoamyl axetat, isobutyl axetat, β -phenyletanol, α -terpineol, c-whisky lacton và vanilin.

Theo đánh giá cảm quan, đã thấy rõ ràng rằng vị lạ của đất được cho là ít hơn nhiều trong nước ép rau củ đã được lên men với *Pichia kluyveri*. Nước ép đã được lên men cũng có vị trái cây và cay hơn và tổng thể được ưa thích hơn so với nước ép không được lên men.

Sáng chế đề xuất theo khía cạnh thứ nhất việc sử dụng *Pichia kluyveri* để tạo ra đồ uống bao gồm nguyên liệu rau củ. Đã phát hiện ra rằng *Pichia kluyveri* có thể được sử dụng có lợi để xử lý nước ép rau củ, đặc biệt là nước ép rau củ có hương vị đất không mong muốn. Hương vị đất là phổ biến đối với nước ép rau củ được tạo ra từ nguyên liệu thực vật được trồng trong hoặc tiếp xúc với đất. Do đó, mong muốn tăng cường hương vị của nước ép rau củ bằng cách làm giảm vị đất. Do đó, sáng chế đề xuất chiến lược khác để cải thiện đặc tính hương vị khác với các phương pháp hiện nay được sử dụng trong ngành công nghiệp, liên quan đến việc sử dụng kỹ thuật cơ học hoặc pha trộn nước ép trái cây.

Pichia kluyveri được ưu tiên bao gồm chủng *Pichia kluyveri* 1, chủng *Pichia kluyveri* 2 và chủng *Pichia kluyveri* 3 cũng như các thể đột biến của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng *Pichia kluyveri* để làm giảm hương vị đất của nguyên liệu thực vật. Việc sử dụng này bao gồm bước lên men nguyên liệu thực vật, đặc biệt là rau củ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xử lý nước ép rau củ để làm giảm hương vị đất của nó và nước ép rau củ thu được từ đó. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước (a) cung cấp cơ chất bao gồm nguyên liệu rau củ, (b) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này, (c) lên men cơ chất, và (d) thu được nước ép rau củ đã được lên men. Cần phải hiểu rằng cơ chất có thể bao gồm nhiều hơn một loại rau củ.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất nước ép rau củ thu được bằng phương pháp được mô tả theo sáng chế, cũng như nước ép rau củ bao gồm một hoặc nhiều *Pichia kluyveri*, như chủng *Pichia kluyveri* được mô tả ở đây.

Sáng chế đề xuất bổ sung chủng *Pichia kluyveri* mới được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 thể hiện phân tích cảm quan nước ép củ cải đường được tạo ra bằng cách lên men bằng chủng *Pichia kluyveri* 1 và chủng *Pichia kluyveri* 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rau củ" dùng để chỉ phần có thể ăn được của thực vật mà con người tiêu thụ. Phần ăn được của cây có thể là rễ, như rutabaga, củ cải, cà rốt, và khoai lang; củ hoặc thân lưu trữ, như khoai tây và khoai môn; thân cây, như trong măng tây và su hào; chồi, như cải Bí; củ, như hành tây và tỏi; cuống lá hay cành lá, như cần tây và đại hoàng; lá, như bắp cải, rau củ diếp, rau củ mùi tây và rau củ bina; hoa chưa trưởng thành, như súp lơ, bông cải xanh và atisô.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rau củ" là phần ăn được của loại rau củ tiếp xúc với đất. Rau củ nói chung là các cơ quan dự trữ, được mở rộng để lưu trữ năng lượng dưới dạng hydratcacbon. Cần lưu ý rằng "rau củ" như được sử dụng ở đây không chỉ giới hạn ở rễ được định nghĩa trong thực vật học, nhưng cũng bao gồm cả rễ thực (như rễ và rễ củ) và thân (như củ, thân, thân rễ, và củ).

Nói chung, "vị lạ" để chỉ sự có mặt của vị và/hoặc mùi khó chịu trong thực phẩm. "Đất" là hương vị giống như đất. Do hương vị này là hương vị không mong muốn trong các sản phẩm thực phẩm, ở đây nó còn được gọi là "vị lạ của đất". Mùi của đất phần lớn đã được quy cho sự có mặt của geosmin (Gerber, N. N., and H. A. Lechevalier. "Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes." *Applied microbiology* 13.6 (1965): 935-938). Geosmin đã được xác định đặc điểm trong đất (Buttery, Ron G., and John A. Garibaldi. "Geosmin and methylisoborneol in garden soil." *Journal of agricultural and food chemistry* 24.6 (1976): 1246-1247) và đã được chứng minh là nguyên nhân gây ra mùi đất trong rau củ như củ cải (Acree, T. E., et al. "Geosmin, the earthy component of Table beet odor." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24,2 (1976): 430-431).

Tuy nhiên, geosmin rất khó đo do yêu cầu thiết bị cụ thể. Tuy nhiên, hương vị đất gây ra bởi geosmin có thể được đánh giá một cách đáng tin cậy bằng cách sử dụng phân tích cảm quan đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, "làm giảm hương vị đất" như được sử dụng ở đây để chỉ việc giảm mức độ nhận biết hương

vị đất. Điều này có thể được thực hiện bằng cách so sánh hương vị đất trước khi và sau khi xử lý bằng *Pichia kluyveri*. Mức so sánh này có thể được đánh giá bằng các phương pháp đánh giá cảm quan đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong Meilgaard et al (Meilgaard, Morten C., B. Thomas Carr, and Gail Vance Civille. *Sensory evaluation techniques*. CRC press, 1999) hoặc như được mô tả trong đơn sáng chế.

Hương vị đất có thể được đo bằng phân tích cảm quan như được mô tả trong ví dụ.

Thuật ngữ “cơ chất” để chỉ nguyên liệu được lên men bằng *Pichia kluyveri*.

Thuật ngữ “không còn” ở đây để chỉ hàm lượng còn thấp hơn 0,5% thể tích/thể tích.

Thuật ngữ “tăng cường hương vị” của sản phẩm nghĩa là cải thiện đặc tính hương vị của sản phẩm để nó trở nên thơm ngon hơn. Điều này có thể được xác định, ví dụ, bằng đánh giá cảm quan đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “quá trình lên men” thường để chỉ hoạt động hoặc quá trình bất kỳ liên quan đến sự phân hủy (tiêu hóa) bằng enzym các nguyên liệu hữu cơ nhờ vi sinh vật. Thuật ngữ “quá trình lên men” bao gồm cả quá trình kỵ khí và hiếu khí, cũng như các quá trình liên quan đến sự kết hợp hoặc lần lượt của một hoặc nhiều giai đoạn kỵ khí và/hoặc hiếu khí.

Thuật ngữ “thể đột biến” nên được hiểu là chủng có nguồn gốc từ chủng theo sáng chế nhờ, ví dụ, xử lý bằng di truyền, phóng xạ và/hoặc hóa học. Tốt hơn là, thể đột biến là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ, thể đột biến về cơ bản giống, hoặc cải tiến, các đặc tính như chủng bố mẹ. Trong nội dung sáng chế, tốt hơn là thể đột biến theo sáng chế là thể đột biến có các đặc tính giống nhau hoặc được cải thiện liên quan đến việc giảm hương vị đất. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Thể đột biến có thể là chủng thu được bằng cách đưa chủng theo sáng chế vào xử lý đột biến được sử dụng thông thường bất kỳ, bao gồm xử lý bằng chất gây đột biến hóa học như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng UV hoặc là thể đột biến xuất hiện tự phát. Thể đột biến có thể đã được đưa vào một số phương

pháp xử lý gây đột biến (một xử lý duy nhất nên được hiểu là một bước gây đột biến tiếp theo là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng theo sáng chế tốt hơn là không nhiều hơn 1000, không nhiều hơn 100, không nhiều hơn 20, không nhiều hơn 10, hoặc không nhiều hơn 5, bước xử lý được thực hiện. Theo thể đột biến được ưu tiên theo sáng chế, thấp hơn 5%, hoặc thấp hơn 1% hoặc thậm chí thấp hơn 0,1% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn đã được thay đổi (như bằng cách thay thế, khuyết đoạn, cài xen hoặc tổ hợp của chúng) so với chủng bố mẹ.

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực kỹ thuật đồ uống không cồn. Cần phải hiểu rằng đồ uống như vậy có nồng độ etanol thấp hơn 0,5% (thể tích/thể tích).

Được thúc đẩy bởi những người tiêu dùng có ý thức về sức khỏe, những người đang tìm cách hạn chế uống rượu, lĩnh vực đồ uống không cồn và có độ cồn thấp đang phát triển nhanh chóng. Đặc biệt là, nước ép rau củ đang ngày càng trở nên phổ biến đối với những người tiêu dùng hướng đến sức khỏe. Tuy nhiên, đặc tính hương vị của nước ép rau củ không phải lúc nào cũng hấp dẫn. Do đó, nhu cầu liên tục về việc cung cấp các sản phẩm có đặc tính hương vị cải tiến cho thị trường.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp thu được nước ép rau củ đã được lên men, bao gồm bước bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất bao gồm rau củ, và lên men cơ chất để thu được nước ép rau củ đã được lên men. Sáng chế dựa trên việc phát hiện ra rằng *Pichia kluyveri* có các đặc tính có lợi hữu ích trong việc xử lý nước ép rau củ, đặc biệt là trong việc làm giảm vị lạ của đất cũng như tăng cường hương vị trái cây và hoa.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp bao gồm:

- a) cung cấp cơ chất bao gồm rau củ,
- b) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này, và
- c) lên men cơ chất bao gồm chủng *Pichia kluyveri*.

Theo phương án được ưu tiên khác, phương pháp bao gồm:

- a) cung cấp cơ chất bao gồm rau củ,
- b) điều chỉnh độ pH của cơ chất,
- c) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này, và
- d) lên men cơ chất bao gồm chủng *Pichia kluyveri*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế cũng đề xuất nước ép rau củ đã được lên men thu được bằng phương pháp được mô tả ở đây.

Nước ép rau củ đã được lên men không chứa cồn. Theo một ví dụ, hàm lượng cồn (thể tích/thể tích) của nước ép rau củ đã được lên men là thấp hơn 0,5%, như thấp hơn 0,4%, như thấp hơn 0,3%, như thấp hơn 0,2%, như thấp hơn 0,1%, như thấp hơn 0,09%, như thấp hơn 0,08%.

Dự tính rằng *Pichia kluyveri* là đặc biệt hữu ích để xử lý tất cả các loại rau củ có hương vị đất. Rau củ này bao gồm cụ thể cả rau củ.

Hương vị đất, đặc điểm đặc trưng của nhiều nước ép rau củ, được gây ra bởi hợp chất thơm geosmin. Geosmin (*trans*-1,10-dimetyl-*trans*-9-decalol) là hợp chất có mùi đất rất khác biệt, mốc, củ cải đường, thậm chí cả hương vị củ cải và có ngưỡng cảm giác cực kỳ thấp xuống tới 10 ppm. Nó là chất chuyển hóa của nhiều loại xạ khuẩn và nấm. Nó đã được phát hiện là nguyên nhân gây ra mùi đất trong các loại thực phẩm khác nhau, bao gồm cá và rượu. Đã có báo cáo một số vi khuẩn như loài *Bacillus subtilis* và *Pseudomonas* gây phân hủy sinh học geosmin. Tuy nhiên, chưa có báo cáo rằng quá trình lên men bằng *Pichia kluyveri* có thể dẫn đến việc làm giảm vị lạ từ geosmin.

Để tạo ra nước ép rau củ theo sáng chế, sáng chế đề xuất cơ chất bao gồm rau củ.

Rau củ có thể có nguồn gốc từ một hoặc nhiều loại rau củ. Ví dụ, cơ chất có thể bao gồm nguyên liệu từ một rau củ cụ thể hoặc các loại rau củ khác nhau. Ngoài ra, cơ chất có thể cũng chứa thêm các nguyên liệu thực vật khác, ví dụ, cơ chất có thể bao gồm hỗn hợp của dạng rau củ và trái cây. Theo phương án khác, cơ chất về cơ bản cấu thành từ rau củ.

Cơ chất theo sáng chế bao gồm rau củ. Ví dụ, rau củ là loại rau củ bất kỳ trong số các loại rau củ đã biết. Rau củ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, rễ thực, ví dụ, rễ củ và rễ cây, và phần không phải là rễ, ví dụ, củ, thân rễ, thân và củ.

Rau củ thực có thể là rễ cái và/hoặc rễ củ. Ví dụ về rễ cái bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, củ từ (*Arracacia xanthorrhiza*), cà rốt bụi (*Abelmoschus moschatus*), củ cải và củ cải ngọt (*Beta vulgaris*), củ cải Thụy Điển và củ cải

(*Brassica* spp.), thì là đen (*Bunium persicum*), ngưi bằg (*Arctium*), cà rốt (*Daucus carota* subsp. *sativus*), cần tây (*Apium graveolens rapaceum*), củ cải trắng (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*), bồ công anh (*Taraxacum* spp.), mắca (*Lepidium meyenii*), củ từ (*Microseris scapigera*), củ sắ và củ đậu (*Pachyrhizus* spp.), củ cải vàng (*Pastinaca sativa*), rắ mùi tây (*Petroselinum* spp.), củ cải (*Raphanus sativus*), diếp củ đen (*Scorzonera hispanica*), skirret (*Sium sisarum*), diếp củ (*Tragopogon* spp.), và đậu đũa (*Vigna lanceolata*).

Ví dụ về rắ củ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tỏi đá (*Amorphophallus galbra*), mắ châu nhắ hoặc cây lạc (*Conopodium majus*), củ mắ, khoai lang Trung Quốc, củ mắ Hàn Quốc (*Dioscorea opposita*), gừng tự nhiên (*Hornstedtia scottiana*), khoai lang (*Ipomoea batatas*), bìm bìm (*Ipomoea costata*), sắ hoặc mắg tây hoặc khoai mì (*Manihot esculenta*), mauka hoặc cây nắ ắ (*Mirabilis extensa*), hoàng liên, tipsin, hoặc củ thảo nguyên (*Psoralea esculenta*), và sâm Mỹ (*Smallanthus sonchifolius*).

Ví dụ về rau củ bao gồm thân giống rắ là Florida cây hoàng tinh (*Zamia pumila*).

Phần không phải là rắ bao gồm thân củ, thân rắ, thân hành và/hoặc củ. Ví dụ về thân hành bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khoai nư (*Amorphophallus khoai nư*), khoai môn bản địa (*Colocasia esculenta*), hạt dẻ nước Trung Quốc (*Eleocharis dulcis*), chuối (*Ensete* spp.), sen hồng (*Nelumbo nucifera*), củ mắ hoặc cây từ cô (*Sagittaria* spp.), khoai môn hoặc khoai mùng (*Xanthosoma* spp.).

Ví dụ về thân rắ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây nghệ (*Curcuma longa*), nhắ sâm (*Panax ginseng*), củ tóc tiên và hoa loa kèn (*Arthropodium* spp.), rong riềg (*Canna* spp.), cây huyết dụ (*Cordyline fruticosa*), cây hoàng tinh (*Maranta arundinacea*), rắ sen (*Nelumbo nucifera*), cattail hoặc cây hương bồ (*Typha* spp.), ginger, củ riềg (*Zingiber officinale*).

Ví dụ về thân củ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hog khoai tây hoặc đậu phộng (*Apios americana*), hạt hồ hoặc củ gắ ngọt (*Cyperus esculentus*); củ mắ, củ nắ (*Dioscorea* spp.), atisô Jerusalem hoặc củ vu (*Helianthus tuberosus*), cây hoa hiề (*Hemerocallis* spp.), đậu hoa (*Lathyrus tuberosus*), củ từ New

Zealand và chua me (*Oxalis tuberosa*), kembili, hoa môi (*Plectranthus edulis* và *P. esculentus*), khoai tây (*Solanum tuberosum*), atiso Trung Quốc hoặc hoa môi (*Stachys affinis*), mashua hoặc sen cạn (*Tropaeolum tuberosum*), và chua me đất (*Ullucus tuberosus*).

Ví dụ về củ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tỏi, hành tây, hẹ tây, tỏi tây, v.v. (*Allium* spp.), hoa huệ (*Camassia quamash*), cói (*Cyperus bulbosus*), katakuri (*Erythronium* spp.), cây thì là (*Foeniculum vulgare*) và hoa loa kèn (*Lilium* spp.),

Rau củ có thể khác nhau về hàm lượng dinh dưỡng, ví dụ, thành phần hydratecacbon. Ví dụ, thân củ có thể chứa nhiều tinh bột hơn so với rau củ thực, có thể chứa nhiều đường đơn hơn. Cả rễ thực và phần không phải là rễ là nguồn cung cấp các vitamin, khoáng chất và các chất dinh dưỡng khác, như chất xơ, kali, vitamin A, calcium, vitamin B6, vitamin C, biotin, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B3, sắt, đồng và magie.

Rau củ thích hợp được sử dụng để tạo ra nước ép rau củ có thể là cây một lá mầm, cây hai lá mầm, hoặc hỗn hợp của chúng. Ví dụ về cây một lá mầm ("monocot") bao gồm củ từ, như củ từ trắng, củ từ vàng, Kokoro, củ từ Nhật Bản, củ từ tía, củ sắn, Malanga, hoặc tổ hợp của chúng.

Ví dụ về cây hai lá mầm bao gồm khoai lang, Batas, khoai lang Bzazil, khoai lang Dingess, khoai lang tía Nhật Bản, khoai lang Okinawan, khoai lang Mokuau, khoai lang Covington, khoai lang Beauregard.

Cơ chất được mô tả ở đây có thể bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều loại rau củ. Ví dụ, cơ chất có thể bao gồm cà rốt và củ cải đường. Theo các phương án khác, cơ chất bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều loại rau củ khác nhau.

Ví dụ được ưu tiên về rau củ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cà rốt, củ cải đường, củ cải vàng, củ cải Thụy Điển, nghệ, gừng, khoai tây, khoai lang, củ cải, củ cải Thụy Điển, ngọc giá, su hào, hành, tỏi, rễ cần tây, củ cải ngựa, củ cải trắng, củ sắn, củ cải, atisô Jerusalem, và củ từ.

Phương pháp tạo ra cơ chất có thể được nêu theo cách sau: rửa rau củ, tùy ý xay rau củ thành bã và chiết phẩm (tốt hơn là bằng cách ép) nước ép rau củ

không có cùi. Tùy thuộc vào dạng rau củ, nó có thể được thanh trùng hoặc tiệt trùng nếu muốn. Thành phần bổ sung cũng có thể có mặt trong cơ chất.

Theo một phương án, nước ép rau củ có thể được axit hóa. Việc này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách bổ sung chất axit hóa như axit xitric, axit lactic, nước chanh hoặc dạng tương tự. Theo cách khác, việc này cũng có thể được thực hiện bằng cách lên men bằng vi khuẩn axit lactic. Việc axit hóa có thể được sử dụng để làm ổn định nước ép để làm giảm sự phát triển của nguồn bệnh trong thành phẩm.

Do đó, theo phương án khác sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm:

- a) cung cấp cơ chất bao gồm rau củ,
- b) điều chỉnh độ pH của cơ chất,
- c) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này, và
- d) lên men cơ chất bao gồm chủng *Pichia kluyveri*.

Tốt hơn là, độ pH được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 2,5 đến 6,5, như nằm trong khoảng từ 2,5 đến 6 hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 5,5. *Pichia kluyveri* có thể lên men nước ép ở các khoảng pH này. Độ pH của cơ chất có thể được điều chỉnh theo sản phẩm mong muốn bởi người tiêu dùng.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm bước bổ sung *Pichia kluyveri* vào cơ chất. Việc này có thể bao gồm việc bổ sung một hoặc nhiều chủng *Pichia kluyveri*, như 1, 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều chủng *Pichia kluyveri*. Như được sử dụng ở đây, “chủng” *Pichia kluyveri* nghĩa là biến thể di truyền của *Pichia kluyveri*, dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên kiểu gen của nó.

Pichia kluyveri được bổ sung vào cơ chất với lượng đủ để khơi mào và duy trì quá trình lên men. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng có thể xác định nồng độ cấy thích hợp của *Pichia kluyveri* theo phần mô tả và ví dụ.

Theo các phương án được ưu tiên, *Pichia kluyveri* được cấy với nồng độ ít nhất là 1×10^4 CFU/ml, như ít nhất là 5×10^4 CFU/ml, như ít nhất là 1×10^5 CFU/ml, như ít nhất là 5×10^5 CFU/ml, như ít nhất là 1×10^6 CFU/ml, như ít nhất là 5×10^6 CFU/ml.

Theo các phương án khác, hỗn hợp của nhiều hơn một chủng, như 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều chủng *Pichia kluyveri* có thể được sử dụng.

Hơn nữa, *Pichia kluyveri* đã bổ sung có thể ở dạng đông lạnh, lỏng hoặc khô bao gồm, ví dụ, dạng đông khô và dạng phun/sấy khô dạng lỏng, hoặc dạng cô đặc đông lạnh hoặc đông khô.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm bước lên men cơ chất bao gồm *Pichia kluyveri* đã được bổ sung. Tốt hơn là, quá trình lên men cơ chất được thực hiện bằng cách lên men có kiểm soát trong môi trường vô trùng. Trong quá trình lên men, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chọn lọc thực hiện một số tùy chọn khác đã biết đối với họ như nhưng không chỉ giới hạn ở, bổ sung pectinaza trong quá trình xay/ép, điều chỉnh độ pH, bổ sung lưu huỳnh dioxit dưới dạng chất kháng khuẩn, làm sạch và lọc, để thu được sản phẩm cuối mong muốn.

Tốt hơn là, quá trình lên men cơ chất bằng *Pichia kluyveri* được thực hiện trong ít nhất là 12 giờ, như trong 18 giờ, như trong 24 giờ, như trong 36 giờ, như trong 48 giờ. Tốt hơn là, quá trình lên men không vượt quá 48 giờ, vì hàm lượng còn có thể tăng đến mức mà không mong muốn đối với sản phẩm cuối dự định. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng chọn lựa thời gian lên men thích hợp dựa trên đặc tính mong muốn của sản phẩm.

Theo các phương án khác, quá trình lên men không vượt quá 36 giờ. Theo các phương án khác, quá trình lên men được thực hiện nằm trong khoảng từ 12 và 48 giờ.

Tốt hơn là, điều kiện lên men bằng cách sử dụng *Pichia kluyveri* là bán kỵ khí. Quá trình lên men như vậy có thể bắt đầu là kỵ khí và tiếp theo là yếm khí sau khi đã tiêu thụ hết oxy.

Theo các phương án khác của sáng chế, *Pichia kluyveri* được bổ sung vào cơ chất dưới dạng môi trường nuôi cấy ban đầu. Thuật ngữ “môi trường nuôi cấy ban đầu” để chỉ thành phần bao gồm vi sinh vật sống có khả năng khởi mào hoặc thực hiện quá trình lên men nguyên liệu hữu cơ, tùy chọn sau khi được nuôi cấy trong môi trường khởi động riêng biệt để thu được môi trường nuôi cấy mật độ cao. Theo đó, theo một phương án, môi trường nuôi cấy ban đầu theo sáng chế có

thể là môi trường nuôi cấy mật độ cao thu được bằng cách nhân giống môi trường nuôi cấy ban đầu trong môi trường thích hợp.

Môi trường nuôi cấy ban đầu theo sáng chế cũng có thể chứa, ngoài vi sinh vật, chất tạo đệm và chất dinh dưỡng kích thích tăng trưởng hoặc chất bảo quản hoặc chất mang khác.

Theo phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy ban đầu thứ nhất chứa ít nhất là 10^2 đơn vị tạo thành khuẩn lạc (CFU)/g *Pichia kluyveri*, như ít nhất là 10^3 CFU/g, như ít nhất là 10^4 CFU/g, như ít nhất là 10^5 CFU/g, như ít nhất là 10^6 CFU/g, như ít nhất là 10^7 CFU/g, như ít nhất là 10^8 CFU/g, như ít nhất là 10^9 CFU/g, như ít nhất là 10^{10} CFU/g, như ít nhất là 10^{11} CFU/g, như ít nhất là 10^{12} CFU/g, như ít nhất là 10^{13} CFU/g.

Quá trình lên men có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng 4-35°C. Theo các phương án được ưu tiên, quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18 đến 22°C, như nằm trong khoảng 19-21°C, như 20°C.

Quá trình lên men có thể được kết thúc bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm hạ nhiệt, tốt nhất là đến dưới 4°C, và/hoặc thanh trùng. Sau đó, nước ép rau củ đã được lên men thu được. Tốt hơn là, chất lỏng lên men được tách ra khỏi chất rắn bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách lọc hoặc ly tâm.

Tùy thuộc vào sản phẩm, có thể bao gồm thêm các thành phần bổ sung trong nước ép lên men, như chất làm đặc, đường, chất tạo ngọt, chất xơ ăn kiêng, xi-rô, chất tạo đệm, chất điều chỉnh độ pH, muối, khoáng chất thiết yếu, pectin, protein, chất tạo hương, chất tạo màu, vitamin, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, v.v.

Cũng được dự tính rằng chất lỏng đã được lên men có thể được xử lý tiếp, ví dụ, bằng cách cô đặc, pha loãng hoặc trộn với các sản phẩm khác.

Tốt hơn là, nước ép đã được lên men được nạp vào các chai và tùy ý thanh trùng. Theo các phương án khác nước ép đã được lên men không được thanh trùng.

Axetat este là hợp chất tạo hương vị quan trọng trong đồ uống. Ví dụ, axetat este nổi tiếng nhất là isoamyl axetat và etyl axetat. Etyl axetat là chất lỏng tạo mùi hoa quả với một ghi chú là mạnh và là este thông dụng trong trái cây. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng mức etyl axetat trong nước ép rau củ với *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo các phương án khác, mức etyl axetat ít nhất là 10 ppm, như ít nhất là 12 ppm, ít nhất là 13 ppm, ít nhất là 14 ppm, ít nhất là 15 ppm, ít nhất là 16 ppm, ít nhất là 17 ppm, ít nhất là 18 ppm, ít nhất là 19 ppm, ít nhất là 20 ppm, ít nhất là 21 ppm, ít nhất là 22 ppm, ít nhất là 23 ppm, ít nhất là 24 ppm, ít nhất là 25 ppm, ít nhất là 26 ppm, ít nhất là 27 ppm, ít nhất là 28 ppm, ít nhất là 29 ppm, hoặc ít nhất là 30 ppm.

Isoamyl axetat, còn được biết là isopentyl axetat, là hợp chất hữu cơ là este được hình thành từ rượu isoamylic và axit axetic. Isoamyl axetat xuất hiện tự nhiên trong cây chuối. Nó có mùi nồng nặc cũng được mô tả là giống mùi chuối và mùi lê. Tuy nhiên, ở lượng cao nó tạo ra một axeton rõ ràng như mùi lạ có thể được coi là khó chịu.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng mức isoamyl axetat trong nước ép rau củ với *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, isoamyl axetat trong nước ép rau củ đã được lên men được tạo ra theo sáng chế ít nhất là 2 ppm, như ít nhất là 2,1 ppm, ít nhất là 2,2 ppm, ít nhất là 2,3 ppm, ít nhất là 2,4 ppm, ít nhất là 2,5 ppm, ít nhất là 2,6 ppm, ít nhất là 2,7 ppm, ít nhất là 2,8 ppm, ít nhất là 2,9 ppm, ít nhất là 3,0 ppm, ít nhất là 3,1 ppm, ít nhất là 3,2 ppm, ít nhất là 3,3 ppm, ít nhất là 3,4 ppm, ít nhất là 3,5 ppm, ít nhất là 3,6 ppm, ít nhất là 3,7 ppm, ít nhất là 3,8 ppm, ít nhất là 3,9 ppm, hoặc ít nhất là 4,0 ppm.

Tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat là chỉ số tốt của mùi trái cây. Giống như ethanol, etyl axetat là este của ethanol và axetic hoạt động như dung môi. Nó góp phần vào việc giải phóng hương vị của isoamyl axetat.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng tỷ lệ khối lượng như vậy trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat của nước ép đã được lên men được tạo ra theo sáng chế ít nhất là 0,1, như ít

nhất là 0,11, ít nhất là 0,12, ít nhất là 0,13, ít nhất là 0,14, ít nhất là 0,15, ít nhất là 0,16, ít nhất là 0,17, ít nhất là 0,18, ít nhất là 0,19, hoặc ít nhất là 0,2. Tốt hơn là, tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat của nước ép đã được lên men ít nhất là 0,2, như ít nhất là 0,21, ít nhất là 0,22, ít nhất là 0,23, ít nhất là 0,24, ít nhất là 0,25, ít nhất là 0,26, ít nhất là 0,27, ít nhất là 0,28, ít nhất là 0,29, hoặc ít nhất là 0,30.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng tỷ lệ khối lượng như vậy của isoamyl axetat và etanol trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etanol của nước ép đã được lên men được tạo ra theo sáng chế ít nhất là 0,0002, như ít nhất là 0,0003, ít nhất là 0,0004, ít nhất là 0,0005, ít nhất là 0,0006, ít nhất là 0,0007, ít nhất là 0,0008, ít nhất là 0,0009, ít nhất là 0,001, ít nhất là 0,0011, ít nhất là 0,0012 hoặc cao hơn.

Đã phát hiện ra rằng nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* chứa nhiều hợp chất tạo hương vị hơn, bao gồm β -phenyletanol và α -terpineol. β -phenyletanol có hương vị giống hoa hồng và tác động hiệp đồng với các hợp chất tạo hương vị khác như este để tăng cường ấn tượng tổng thể mùi trái cây. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng β -phenyletanol trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, β -phenyletanol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 0,2 ppm, như ít nhất là 0,3 ppm, như ít nhất là 0,4 ppm, như ít nhất là 0,5 ppm, như ít nhất là 0,6 ppm, như ít nhất là 0,7 ppm.

α -terpineol có mùi dễ chịu tương tự như mùi hoa cà. Nó là một loại rượu terpen được tìm thấy trong các loại dầu tự nhiên như dầu thông. Nó cũng là một trong những loại rượu monotерpen quan trọng nhất về mặt thương mại cho ngành hương vị. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng α -terpineol trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, α -terpineol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 5 ppb, như ít nhất là 10 ppb, như ít nhất là 20 ppb, như ít nhất là 30 ppb, như ít nhất là 40 ppb, như ít nhất là 50 ppb, như ít nhất là 60 ppb, hoặc như ít nhất là 70 ppb.

c-whisky lacton (cis-whisky lacton), còn được gọi là (3*S*,4*S*)-3-metyl-4-octanolit, là thành phần quan trọng tạo nên mùi thơm của rượu whisky và các đồ uống có cồn khác đã được hóa già trong các thùng gỗ sồi. Đôi khi nó được bổ sung vào rượu dưới dạng chất tạo hương vị. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng c-whisky lacton trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men.

Theo một số phương án được ưu tiên, c-whisky lacton trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 1 ppb, như ít nhất là 2 ppb, như ít nhất là 3 ppb, như ít nhất là 4 ppb, như ít nhất là 5 ppb, như ít nhất là 6 ppb, như ít nhất là 7 ppb.

Vanilin, một aldehyt phenol, là hợp chất tạo hương vị và mùi thơm chính trong vani. Với mùi vani ngọt và dạng kem, vanilin được sử dụng thường xuyên hơn chiết phẩm vani tự nhiên dưới dạng chất tạo hương vị trong thực phẩm, đồ uống và dược phẩm. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vanilin trong nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* được tăng sau khi lên men. Theo một số phương án được ưu tiên, vanilin trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 2 ppb, như ít nhất là 3 ppb, như ít nhất là 4 ppb, như ít nhất là 5 ppb, như ít nhất là 6 ppb, như ít nhất là 7 ppb.

Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất nước ép rau củ đã được lên men có đặc tính hương vị cải thiện. Nước ép rau củ được tạo ra theo sáng chế bao gồm rau củ và *Pichia kluyveri*, có thể là, ví dụ, chủng *Pichia kluyveri* 1, chủng *Pichia kluyveri* 2, chủng *Pichia kluyveri* 3, các thể đột biến của chúng hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Chủng *Pichia kluyveri* 1 được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484.

Chủng *Pichia kluyveri* 2 được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711.

Chủng *Pichia kluyveri* 3 được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712.

Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất Sử dụng *Pichia kluyveri* để lên men rau củ. Theo các phương án khác, chủng *Pichia kluyveri* 1, chủng *Pichia kluyveri* 2, chủng *Pichia kluyveri* 3, các thể đột biến của chúng hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng được sử dụng để lên men rau củ để thu được nước ép rau củ như được mô tả trong đơn sáng chế.

Các tác giả sáng chế đã cho thấy chủng *Pichia kluyveri* có ảnh hưởng rất lớn đến đặc tính hương vị của sản phẩm nước ép trái cây lên men cuối cùng. Mức tăng rất lớn đã được phát hiện bất ngờ cho tất cả các hợp chất tạo hương vị mong muốn, như este và terpen. Như thể hiện trong các ví dụ, phân tích hương vị tương ứng tốt với đánh giá cảm quan. Đánh giá cảm quan đã chứng minh được rằng nước ép rau củ được lên men bằng *Pichia kluyveri* có ít vị lạ của đất và nhiều vị hoa quả và mùi thơm của gia vị so với mẫu đối chứng không được lên men.

Sáng chế đề xuất thêm sản phẩm là chủng *Pichia kluyveri* 1 ở dạng đông lạnh, đông khô, hoặc lỏng, bao gồm, ví dụ, dạng đông khô và dạng phun/khô tăng sôi, hoặc chất cô đặc đông lạnh hoặc đông khô. Chế phẩm của các dạng khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và Ví dụ được mô tả trong WO2011/134952 (Chr. Hansen A/S). *Pichia kluyveri* có thể được sinh trưởng trong thiết bị lên men và cô đặc. Ngoài ra, chất bảo vệ cryo có thể được bổ sung để duy trì khả năng tồn tại của nấm men ở nhiệt độ thấp. Sản phẩm có thể được bổ sung trực tiếp vào cơ chất bao gồm rau củ.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm để tạo ra đồ uống lên men, bao gồm chủng *Pichia kluyveri* 1.

ĐỀ MỤC

Các đề mục sau là các phương án được ưu tiên theo sáng chế:

1. Phương pháp làm giảm vị lạ của đất của nước ép rau củ, bao gồm các bước:
 - a) cung cấp cơ chất bao gồm rau củ,

- b) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này,
 - c) lên men cơ chất bao gồm chủng *Pichia kluyveri* trong thời gian ngắn hơn 48 giờ,
 - d) thu được nước ép rau củ đã được lên men.
2. Phương pháp theo đề mục 1, trong đó rau củ được chọn từ nhóm bao gồm cà rốt, củ cải đường, củ cải vàng, củ cải Thụy Điển, nghệ, gừng, khoai tây, khoai lang, củ cải, củ cải Thụy Điển, ngọc giá, su hào, hành, tỏi, rễ cần tây, củ cải ngựa, củ cải trắng, củ sắn, củ cải, atisô Jerusalem, và củ từ.
3. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm:
- a) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484,
 - b) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711,
 - c) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712, và
 - d) các thể đột biến của a), b) hoặc c).
4. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat ít nhất là 0,1, tốt hơn nếu ít nhất là 0,2.
5. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó bước b) còn bao gồm việc bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic vào cơ chất.
6. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó việc lên men trong bước c) được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 35°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 18 đến 22°C.

7. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó β -phenyletanol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 0,4 ppm.
8. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó α -terpineol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 50 ppb.
9. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó c-whisky lacton trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 4 ppb.
10. Phương pháp theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên, trong đó vanilin trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 4 ppb.
11. Nước ép rau củ đã được lên men thu được bằng phương pháp theo theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục nêu trên.
12. Nước ép rau củ đã được lên men bao gồm rau củ và *Pichia kluyveri*.
13. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục 12, trong đó *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484,
 - b) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711,
 - c) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712, và
 - d) các thể đột biến của a), b) hoặc c).
14. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục 12-13, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat ít nhất là 0,1, tốt hơn là ở và/hoặc trong đó tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etanol ít nhất là 0,0002, tốt hơn nếu ít nhất là 0,0008.

15. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục 12-14, trong đó β -phenyletanol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 0,4 ppm.
16. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục 12-15, trong đó α -terpineol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 50 ppb.
17. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục 12-16, trong đó c-whisky lacton trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 4 ppb.
18. Nước ép rau củ đã được lên men theo đề mục bất kỳ trong số các đề mục 12-17, trong đó c vanilin trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 4 ppb.
19. Sử dụng *Pichia kluyveri* để lên men rau củ.
20. Sử dụng theo đề mục 19, trong đó rau củ được chọn từ nhóm bao gồm cà rốt, củ cải đường, củ cải vàng, củ cải Thụy Điển, nghệ, gừng, khoai tây, khoai lang, củ cải, củ cải Thụy Điển, ngọc giá, su hào, hành, tỏi, rễ cần tây, củ cải ngựa, củ cải trắng, củ sắn, củ cải, atisô Jerusalem, và củ từ.
21. Sử dụng theo đề mục 19 hoặc 20, trong đó *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484,
 - b) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711,
 - c) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712, và
 - d) các thể đột biến của a), b) hoặc c).

22. *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484 và các thể đột biến của chúng.
23. Chế phẩm cho quá trình lên men bao gồm *Pichia kluyveri* theo đề mục 22.
24. Chế phẩm theo đề mục 23, trong đó chế phẩm ở dạng đông lạnh, đông khô, hoặc lỏng.

Việc sử dụng các thuật ngữ "a" và "an" và "the" và các các tham chiếu tương tự trong ngữ cảnh mô tả sáng chế (đặc biệt là trong ngữ cảnh yêu cầu bảo hộ) được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác hoặc mâu thuẫn rõ ràng trong ngữ cảnh. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm" và "chứa" được hiểu là các thuật ngữ mở (tức là nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,") trừ khi có quy định khác. Việc ghi lại các khoảng giá trị ở đây chỉ nhằm mục đích làm phương pháp viết tắt để chỉ từng giá trị riêng biệt nằm trong khoảng đó, trừ khi có quy định khác, và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào bản mô tả như thể nó được nhắc lại riêng lẻ ở đây. Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể được thực hiện theo trình tự bất kỳ, trừ khi có quy định khác hoặc mâu thuẫn rõ ràng trong ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ lấy làm ví dụ (ví dụ, "như") được đề xuất ở đây, chỉ dự định để minh họa rõ hơn sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác. Tất cả các ngôn ngữ trong bản mô tả không nên hiểu là chỉ ra yếu tố bất kỳ không yêu cầu bảo hộ cần thiết để thực hành sáng chế.

LƯU GIỮ VÀ GIẢI PHÁP CHUYÊN MÔN

Người nộp đơn yêu cầu các mẫu vi sinh vật đã được nộp lưu được nêu dưới đây chỉ có thể được cung cấp cho chuyên gia, cho đến ngày bằng sáng chế được cấp.

Chủng *Pichia kluyveri* 1 được nộp lưu tại DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) vào ngày 5 tháng 3 năm 2014 bởi Chr. Hansen A/S, Denmark và được cấp số truy cập là DSM 28484. Việc lưu giữ được thực hiện theo các điều

kiện của Hiệp ước Budapest về Công ước quốc tế về việc lưu giữ vi sinh vật nhằm mục đích xử lý tiến trình sáng chế.

Chủng *Pichia kluyveri* 2 (PK-KR1) và chủng *Pichia kluyveri* 3 (PK-KR2) được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập lần lượt là V06/022711 và V06/022712, như được mô tả trong WO 2009/110807.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nước ép cà rốt với độ pH là 4,5 được cung cấp làm cơ chất rau củ quả. Nó được tạo ra bằng cách pha loãng nước ép cà rốt cô đặc.

Quá trình lên men quy mô phòng thí nghiệm (200 ml) được thực hiện. Nước ép cà rốt được cấy hai chủng *Pichia kluyveri* khác nhau, cụ thể là chủng *Pichia kluyveri* 1 (DSM 28484) và chủng 2 (lưu giữ tại Viện đo lường quốc gia với số truy cập là V06/022711) ở 10^5 CFU/ml. Quá trình lên men được thực hiện trong tủ ấm ở 20°C trong 24 giờ. Sau đó mẫu được lấy ra.

Phân tích etanol

Etanol được đo bằng kit phân tích sinh học enzym etanol của Boehringer Mannheim. Nồng độ etanol của sản phẩm lên men sau 24 giờ lên men bằng chủng *Pichia kluyveri* 1 và 2. Bảng 1 thể hiện kết quả của nồng độ etanol trong nước ép cà rốt được lên men và không được lên men.

Bảng 1: Nồng độ etanol trước và sau khi lên men

Mẫu	EtOH% (thể tích/thể tích)	EtOH (ppm)
Không được lên men	0,12	946,8
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	0,34	2682,6
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	0,30	2367

Như được thể hiện, nồng độ etanol trong sản phẩm cà rốt lên men cuối cùng là thấp hơn 0,05% (thể tích/thể tích).

Phân tích hương vị

Việc phân tích hương vị tất cả các sản phẩm lên men được thực hiện trong phòng thí nghiệm về phân tích hương vị và phương pháp chế rượu nho ở Zaragoza, Tây Ban Nha. Bảng 2-6 thể hiện nồng độ của các hợp chất tạo hương vị khác nhau trong mẫu.

Bảng 2: Nồng độ etyl axetat trước và sau khi lên men

Mẫu	Etyl axetat (ppm)
Không được lên men	0,00
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	10,30
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	25,06

Bảng 3: Nồng độ axetat este (isoamyl axetat và isobutyl axetat) trước và sau khi lên men

Mẫu	isoamyl axetat (ppm)	isobutyl axetat (ppm)
Không được lên men	0,12	0,01
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	2,27	0,07
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	2,56	0,18

Bảng 4: Tỷ lệ isoamyl axetat/etyl axetat trước và sau khi lên men

Mẫu	Tỷ lệ giữa isoamyl axetat (ppm) và etyl axetat (ppm)
Không được lên men	0,00
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	0,22
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	0,10

Bảng 5: Tỷ lệ isoamyl axetat/etanol trước và sau khi lên men

Mẫu	Tỷ lệ giữa isoamyl axetat (ppm) và etanol (ppm)
Không được lên men	0,00013
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	0,00085
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	0,00108

Bảng 6: Nồng độ β -phenyletanol trước và sau khi lên men

Mẫu	β -phenyletanol (ppm)
Không được lên men	0,10
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i>	0,86

1		
2	Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i>	0,44

Bảng 7: Nồng độ α -terpineol trước và sau khi lên men

Mẫu	α -terpineol (ppb)
Không được lên men	2,67
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	55,77
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	51,52

Bảng 8: Nồng độ hợp chất thơm (c-whiskylacton và vanilin) trước và sau khi lên men

Mẫu	c-whiskylacton (ppb)	Vanilin (ppb)
Không được lên men	0,00	1,24
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 1	5,44	4,31
Lên men bằng chủng <i>Pichia kluyveri</i> 2	4,91	4,17

Bảng 2-4 cho thấy rõ ràng rằng quá trình lên men nước ép cà rốt bằng *Pichia kluyveri* tăng cường đặc tính este trong sản phẩm lên men cuối cùng. Chỉ sau 24 giờ lên men, nồng độ etyl axetat, isoamyl và isobutyl axetat được tăng ít nhất là hai lần trong nước ép cà rốt lên men.

Đã thấy rằng *Pichia kluyveri* làm tăng tỷ lệ giữa isoamyl axetat (ppm) và etyl axetat. Chủng *Pichia kluyveri* 1 tạo ra ít etyl axetat hơn so với chủng *Pichia kluyveri* 2, nhưng lượng isoamyl axetat tương tự của. Kết quả là, tỷ lệ của isoamyl axetat/etyl axetat là cao hơn ở chủng *Pichia kluyveri* 1.

Ngoài ra, đã thấy rằng *Pichia kluyveri* như được thể hiện làm tăng tỷ lệ giữa isoamyl axetat (ppm) và ethanol (ppm). Chủng *Pichia kluyveri* 1 đã cho thấy tỷ lệ isoamyl axetat (ppm)/ethanol (ppm) thấp hơn so với chủng *Pichia kluyveri* 2, nhưng lượng isoamyl axetat tương tự.

Bảng 6-7 cho thấy nồng độ lần lượt của hai hợp chất tạo hương vị, β -phenyletanol và α -terpineol, respectively. Cả hai hợp chất đều tăng đáng kể trong sản phẩm lên men và góp phần tạo nên hương thơm và vị cay của nó. Chủng *Pichia kluyveri* 1 tạo ra lượng β -phenyletanol và α -terpineol cao hơn so với chủng 2.

Ngoài este, rượu và terpen, các tác giả sáng chế cũng đã khám phá ra rằng một số lacton và thậm chí cả vanilin được tăng, mang lại một hương vị ngọt ngào hơn cho sản phẩm lên men. Nồng độ của c-whiskylacton và vanilin được thể hiện trong Bảng 8.

Ví dụ 2

Nước ép củ cải đường tươi, không bị axit hóa được cung cấp làm cơ chất rau củ quả. Nó được tạo ra bằng cách ép củ cải đường. Quá trình lên men quy mô phòng thí nghiệm (400 ml) được thực hiện. Nước ép củ cải đường được cấy cùng chủng *Pichia kluyveri*, chủng *P. kluyveri* 1 và chủng *P. kluyveri* 2, như được mô tả trong Ví dụ 1. Quá trình lên men được thực hiện trong tủ ấm ở 20°C trong 24 giờ. Sau đó mẫu được lấy ra.

Phân tích cảm quan

Đánh giá cảm quan bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích mô tả theo Lawless et al (Lawless, H. T., và H. Heymann. "Sensory Evaluation of Food: Practices and Principals." Food Science Texts Series. Chapman and Hall. New York (2010)) được tiến hành để đánh giá cách *Pichia kluyveri* đóng góp vào đặc tính hương vị.

Sau khi lên men, bốn thuộc tính rõ ràng của nước ép củ cải đường đã được lên men được xác định. Các thuộc tính này là: mùi đất, tổng thể mùi trái cây, vị cay và vị ngọt. Chín đối tượng tham gia thử nghiệm được chọn và buổi đào tạo về các thuộc tính này được thực hiện. Sau buổi đào tạo này các đối tượng tham gia thử nghiệm được đào tạo để nhận biết mùi thơm và vị của các thuộc tính. Điều này được thực hiện bằng cách ngửi củ cải đường thô cho thuộc tính đất, hạt tiêu cho thuộc tính cay, tổng thể mùi trái cây bằng cách ngửi nước ép trái cây nhiệt đới và vị ngọt bằng cách ngửi nước ép cà rốt.

Sau buổi đào tạo, các đối tượng tham gia thử nghiệm được mời đến buổi nếm thử nước ép đã được lên men. Các loại nước ép trái cây khác nhau cùng với nước ép củ cải đường không được lên men được chỉ định bằng ba số ngẫu nhiên và phục vụ cho mỗi đối tượng đánh giá. Nước ép được phục vụ ở khoảng 10°C trong ly rượu. Các đối tượng tham gia thử nghiệm ghi điểm 4 hương vị (hương

thơm và vị kết hợp) của nước ép, bằng cách chia tỷ lệ trên thang 145 mm (0 là không có, 145 là có với tỷ lệ cao) cũng như theo chủ quan, thích/chấp nhận tổng thể của họ về nước ép.

Fig. 1 thể hiện kết quả của đánh giá cảm quan. Hình vẽ này thể hiện cách các loại nước trái cây khác nhau được đánh giá trên thang điểm 0-145 cho năm thuộc tính khác nhau: vị đất, vị trái cây tổng thể, vị cay, vị ngọt và thích tổng thể như thế nào.

Fig. 1 chứng minh cho thấy tất cả các nước ép được lên men bằng *Pichia kluyveri* được đánh giá là ít mùi đất hơn đáng kể so với nước ép củ cải đường không được lên men (mẫu đối chứng củ cải đường trong Fig. 1). Hơn nữa, mức ngọt của nước ép đã được lên men là rất giống với mẫu đối chứng củ cải đường không được lên men. Chúng cũng được cho là có nhiều mùi trái cây và cay hơn so với mẫu đối chứng..

Nước ép củ cải đường đã được lên men bằng *Pichia kluyveri* nhìn chung được ưa thích hơn so với nước ép củ cải đường không được lên men do vị lạ của đất giảm và hương vị trái cây tăng. chủng *Pichia kluyveri* 1 nhìn chung được ưa thích hơn so với chủng *Pichia kluyveri* 2, mặc dù hương vị trái đất được cho là cao hơn một chút trong nước ép củ cải đường lên men bằng chủng *Pichia kluyveri* 1 so với chủng 2.

Đã phát hiện ra rằng sự khác biệt về hương vị cao nhất đối với các este và α -terpineol. Xem xét gần hơn về nồng độ axetat este cho thấy tỷ lệ của isoamyl axetat/etyl axetat, phép đo tốt về mùi trái cây, được tăng lên trong cả hai chủng *Pichia kluyveri*. Điều này tương ứng tốt với đánh giá cảm quan đã chứng minh được rằng quá trình lên men nước ép rau củ dẫn đến điểm cao hơn đối với mùi trái cây và sự thơm ngon, và điểm thấp hơn nhiều về vị lạ của đất, so với nước ép củ cải đường không được lên men.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm giảm vị lạ của đất trong nước ép rau củ, bao gồm các bước:

- a) cung cấp cơ chất bao gồm rau củ,
- b) bổ sung ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* vào cơ chất này,
- c) lên men cơ chất bao gồm chủng *Pichia kluyveri*,
- d) thu được nước ép rau củ đã được lên men,

trong đó *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484,
- b) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711,
- c) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712, và
- d) các thể đột biến của a), b) hoặc c).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rau củ được chọn từ nhóm bao gồm cà rốt, củ cải đường, củ cải vàng, củ cải Thụy Điển, nghệ, gừng, khoai tây, khoai lang, củ cải, củ cải Thụy Điển, ngọc giá, su hào, hành, tỏi, rễ cần tây, củ cải ngựa, củ cải trắng, củ sắn, củ cải, atisô Jerusalem, và củ từ.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etyl axetat ít nhất là 0,1, tốt hơn nếu ít nhất là 0,2, và/hoặc trong đó tỷ lệ khối lượng giữa isoamyl axetat và etanol ít nhất là 0,0002, tốt hơn nếu ít nhất là 0,0008.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước b) còn bao gồm việc bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic vào cơ chất..

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó việc lên men trong bước c) được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 35°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 18 đến 22°C.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó β -phenyletanol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 0,4 ppm.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó α -terpineol trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 50 ppb.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong đó c-whisky lacton hoặc vanilin trong nước ép rau củ đã được lên men ít nhất là 4 ppb.

9. Nước ép rau củ đã được lên men thu được bởi phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nước ép này bao gồm *Pichia kluyveri*.

10. Nước ép rau củ đã được lên men bao gồm rau củ và *Pichia kluyveri*, trong đó *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm:

a) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484,

b) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022711,

c) *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 24 tháng 8 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số truy cập V06/022712, và

d) các thể đột biến của a), b) hoặc c).

11. Chúng *Pichia kluyveri* được nộp lưu ngày 5 tháng 3 năm 2014 trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và với số truy cập: DSM 28484, và các thể đột biến của chúng.

12. Chế phẩm cho quá trình lên men bao gồm chủng *Pichia kluyveri* theo điểm 11.

13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm ở dạng đông lạnh, đông khô, hoặc lỏng.

1/1

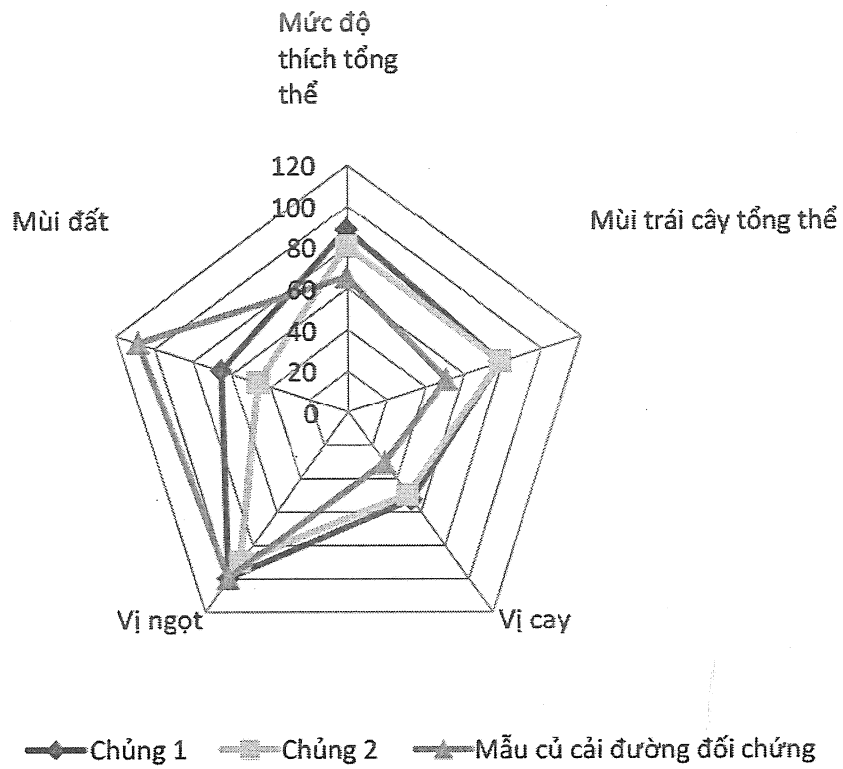


FIG 1