



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0020735

(51)⁷ **A23L 1/228, 1/226**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2011-02960 | (22) | 31.03.2010 | | |
| (86) | PCT/JP2010/055856 | 31.03.2010 | (87) | WO2010/114022A1 | 07.10.2010 |
| (30) | 2009-089347 | 01.04.2009 | JP | | |
| | 2009-291151 | 22.12.2009 | JP | | |
| (45) | 25.04.2019 | 373 | (43) | 25.06.2012 | 291 |
| (73) | AJINOMOTO CO., INC. (JP)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan | | | | |
| (72) | FUTAKI Fumie (JP), YASUDA Reiko (JP), SATO Seiichi (JP), MIYAKI Takashi (JP), MIYAMURA Naohiro (JP), ETO Yuzuru (JP) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD) | | | | |
-

(54) **TÁC NHÂN TRUYỀN VỊ KOKUMI VÀ TÁC NHÂN TRUYỀN VỊ KOKUMI PHỨC HỢP**

(57) Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu nhiều loại hợp chất mà có thể có hoạt tính chủ vận CaSR mong muốn để nhờ đó phát hiện ra chất có khả năng truyền vị kokumi, chất này thể hiện tác dụng truyền vị kokumi mỹ mãn, cụ thể, tác dụng truyền vị kokumi của kiểu truyền vị ban đầu, chất này cũng có tính ổn định mỹ mãn và có thể được sản xuất một cách dễ dàng với chi phí thấp và như vậy, sáng chế đề xuất tác nhân truyền vị kokumi gồm có chất này cũng như tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa chất đó và các chất khác có hoạt tính chủ vận CaSR ở dạng kết hợp. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất tác nhân truyền vị kokumi chứa γ -Glu-Abu (axit L- γ -glutamyl-L-2-amino-butyric) và tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa γ -Glu-Abu kết hợp với chất khác có hoạt tính chủ vận CaSR.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân truyền vị kokumi và tác nhân truyền vị kokumi phức hợp, tác nhân này chứa peptit có hoạt tính chủ vận CaSR. Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm gia vị mà chứa peptit có hoạt tính chủ vận CaSR với nồng độ không nhỏ hơn so với mức định trước.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhu cầu của người tiêu dùng về vị và vị ngon của thực phẩm ngày càng gia tăng do, ví dụ, sự đa dạng về thói quen ăn uống của con người. Theo khía cạnh này, vị và vị ngon của thực phẩm đã được biểu thị bởi năm vị cơ bản, nói cách khác là, vị ngọt, vị mặn, vị chua, vị đắng và vị umami (vị ngon, đậm đà), nhưng ngày càng gia tăng về nhu cầu phát triển tác nhân truyền vị kokumi tuyệt vời mà có khả năng truyền cho thực phẩm vị “vị kokumi” mà có thể truyền các vị được cải thiện hơn nữa cho thực phẩm thậm chí về, ví dụ, độ đậm đà, gia tăng (hoặc sự đầy miệng), liên tục và hài hoà như các dư vị của năm vị cơ bản nêu trên, mà không thể được biểu hiện chỉ bằng năm vị cơ bản này.

Mặt khác, thụ thể nhạy canxi (CaSR) còn được gọi là thụ thể canxi, các tín hiệu được đưa ra từ thụ thể có thể điều khiển nhiều chức năng sinh học trong cơ thể sống và các chất có hoạt tính chủ vận CaSR có thể được sử dụng làm tác nhân truyền vị kokumi (xem các tài liệu sáng chế 1, 3 và tài liệu phi sáng chế 4 như sẽ được mô tả dưới đây).

Người ta mong muốn có nhiều mẫu phát triển vị “vị kokumi” nêu trên. Về khía cạnh này, đã có nhu cầu cấp thiết về sự phát triển tác nhân truyền vị kokumi có khả năng truyền vị kokumi cho thực phẩm, và có mẫu phát triển vị mà có thể gia tăng hoặc bộc lộ vị vị kokumi của kiểu vị ban đầu. Hơn nữa, chất truyền vị kokumi nói chung sẽ được sử dụng trong, ví dụ, thực phẩm và do vậy, nó nên có tính ổn định tốt. Ngoài ra, chất truyền vị kokumi nên được sản xuất một cách dễ dàng với chi phí thấp xét trên quan điểm sản xuất trên quy mô lớn.

Do vậy, đã mong muốn nghiên cứu ra nhiều loại hợp chất có hoạt tính

chủ vận CaSR mong muốn để bằng cách đó phát hiện ra chất có khả năng truyền vị kokumi cho chất khác (thực phẩm hoặc đồ uống), chất này thể hiện tác dụng truyền vị kokumi ưu việt hơn, cụ thể, tác dụng truyền vị kokumi của chất kiểu truyền vị ban đầu, chất này có tính ổn định mỹ mãn và có thể được sản xuất dễ dàng với chi phí thấp và bằng cách đó tạo ra tác nhân truyền vị kokumi chứa cơ chất này cũng như tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa chất này và chất khác có hoạt tính chủ vận CaSR ở dạng kết hợp.

Mặt khác, về các γ -glutamyl peptit mang gốc γ -glutamin ở đầu kết thúc N, đã biết đến các peptit được tổng hợp dưới dạng chất nền, ví dụ, trong các nghiên cứu về hoạt tính enzym (xem tài liệu sáng chế 2 và các tài liệu phi sáng chế 1 đến 3, được đề cập dưới đây), nhưng chưa biết đến bất kỳ trường hợp nào trong đó γ -Glu-Abu được sử dụng làm tác nhân truyền vị kokumi hoặc gia vị hoặc dưới dạng thành phần của thực phẩm. Liên quan đến vấn đề này, toàn bộ nội dung của các tài liệu sáng chế 1 và 3 được kết hợp ở đây dưới dạng các tài liệu tham khảo nếu chúng được bộc lộ rõ ràng trong bản mô tả này.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: WO 2007/055393, toàn bộ;

Tài liệu sáng chế 2: WO 2007/066430, toàn bộ;

Tài liệu sáng chế 3: WO 2008/139945, toàn bộ;

Tài liệu phi sáng chế:

Tài liệu phi sáng chế 1: Molecular Pharmacology (1982), 21(3), 629-36;

Tài liệu phi sáng chế 2: Agricultural and Biological Chemistry (1981), 45(12), 2839-45;

Tài liệu phi sáng chế 3: Journal of Biological Chemistry (1979), 254(12), 5184-90;

Tài liệu phi sáng chế 4: Journal of Biological Chemistry, (2010), 285 (2), 1016-22.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm ra nhiều loại hợp chất có hoạt tính chủ vận CaSR mong muốn để nhờ đó phát hiện ra chất có khả năng truyền vị kokumi, chất này có tác dụng truyền vị kokumi ưu việt hơn, cụ thể, tác dụng truyền vị kokumi của chất kiểu truyền vị ban đầu, chất này có tính ổn định mỹ mãn và có thể được sản xuất dễ dàng với chi phí thấp và nhờ đó tạo ra tác nhân truyền vị kokumi chứa chất có khả năng truyền vị kokumi cũng như tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa chất này và các chất khác có hoạt tính chủ vận CaSR ở dạng kết hợp. Mục đích tiếp theo của sáng chế là đề xuất chế phẩm gia vị chứa chất nêu trên ở nồng độ không thấp hơn mức định trước.

Nhờ nghiên cứu nhiều loại hợp chất, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng γ -Glu-Abu (axit L- γ -glutamyl-L-2-aminolactic) có hoạt tính chủ vận CaSR cao và có tác dụng truyền vị kokumi khá mỹ mãn và, cụ thể, kiểu phát triển vị của nó cho phép truyền vị kokumi của kiểu truyền vị ban đầu cho đối tượng. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng γ -Glu-Abu được phát hiện như vậy có tính ổn định tuyệt vời và có kiểu phát triển vị hữu ích tức là có khả năng truyền vị ban đầu mạnh hơn, so với tính ổn định và kiểu phát triển vị được quan sát thấy đối với γ -Glu-Cys dưới dạng dipeptit tương tự với chất nêu trên. Hơn nữa, γ -Glu-Abu được phát hiện như vậy có thể đóng vai trò làm tác nhân truyền vị kokumi hữu ích và tác nhân truyền vị kokumi phức hợp bằng cách kết hợp chất với các chất khác, mỗi chất thể hiện hoạt tính chủ vận CaSR và nhờ vậy sáng chế đã được hoàn thành.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất tác nhân truyền vị kokumi bao gồm γ -Glu-Abu. Sáng chế cũng đề xuất tác nhân truyền vị kokumi phức hợp mà bao gồm, ở dạng kết hợp, (a) γ -Glu-Abu và (b) một hoặc ít nhất hai axit amin hoặc các peptit được chọn từ nhóm bao gồm γ -Glu-X-Gly trong đó X là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin, γ -Glu-Val-Y trong đó Y là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin, γ -Glu-Ala, γ -Glu-Gly, γ -Glu-Cys, γ -Glu-Met, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Val, γ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, D-Cys, γ -Glu-Met (O), γ -Glu- γ -Glu-Val, γ -Glu-Val-NH₂, γ -Glu-Val-ol, γ -Glu-Ser, γ -Glu-Tau, γ -Glu-Cys (S-Me) (O), γ -Glu-Leu, γ -Glu-Ile, γ -Glu-t-Leu và

γ -Glu-Cys (S-Me).

Sáng chế cũng đề xuất tác nhân truyền vị kokumi phức hợp mà bao gồm, ở dạng kết hợp, (a) γ -Glu-Abu và (b) một hoặc ít nhất hai peptit được chọn từ nhóm bao gồm các peptit được thể hiện bằng công thức chung sau đây: γ -Glu-X-OCH-(Z)-CO₂H (trong đó X là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin và Z là H (nguyên tử hydro) hoặc nhóm CH₃ (nhóm metyl)); và các peptit được thể hiện bằng công thức chung: γ -Glu-Val-Y (trong đó Y là GlyA hoặc LacA).

Tiếp theo, sáng chế đề xuất chế phẩm gia vị (dưới đây còn được gọi là “chế phẩm gia vị theo sáng chế”) mà bao gồm γ -Glu-Abu ở lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, tốt hơn là không thấp hơn 2000ppm khối lượng và tốt hơn nữa là không thấp hơn 2500ppm khối lượng.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế thực phẩm và đồ uống bao gồm các bước bổ sung thành phần cho thực phẩm hoặc đồ uống, thành phần này chứa γ -Glu-Abu ở lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, tốt hơn là không thấp hơn 2000ppm khối lượng và tốt hơn nữa là không thấp hơn 2500ppm khối lượng vào thành phần cho các thực phẩm và đồ uống khác và tùy ý xử lý hoặc chế biến hỗn hợp thu được của các thành phần này. Sáng chế cũng đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống hoặc sản phẩm trung gian được sử dụng để sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống, điều chế theo phương pháp điều chế.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống hoặc sản phẩm trung gian để điều chế thực phẩm hoặc đồ uống, mà bao gồm γ -Glu-Abu ở lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng; ít nhất một axit hữu cơ hoặc muối của nó được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit citric, axit malic và axit succinic và các muối của chúng ở lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng; và muối thường ở lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng; cũng như chất mang dùng cho thực phẩm và đồ uống, và/hoặc một hoặc ít nhất hai thành phần cho gia vị.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường hương thơm và/hoặc vị của thực phẩm hoặc đồ uống, phương pháp này bao gồm bước kết hợp chế phẩm chứa γ -Glu-Abu ở lượng không thấp hơn 400ppm khối

lượng, tốt hơn là không thấp hơn 1000ppm khối lượng, tốt hơn nữa là không thấp hơn 2000ppm khối lượng và vẫn tốt hơn là không thấp hơn 2500ppm khối lượng, vào trong thực phẩm hoặc đồ uống.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế có thể tạo ra tác nhân truyền vị kokumi mà có tác dụng truyền vị kokumi khá mỹ mãn và, cụ thể, có tác dụng truyền vị kokumi của kiểu truyền vị ban đầu mỹ mãn và duy nhất được thể hiện bởi, ví dụ, kiểu phát triển vị mà nó thể hiện biên dạng như được thể hiện trên, ví dụ, Fig. 1, tác nhân này cũng có tính ổn định tuyệt vời và có thể được điều chế một cách dễ dàng với chi phí thấp, cũng như tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa tác nhân này. Ngoài ra, sáng chế có thể cũng tạo ra chế phẩm gia vị mỹ mãn mà bao gồm chất có tác dụng truyền vị kokumi mỹ mãn ở nồng độ không thấp hơn mức định trước.

Tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế có kiểu phát triển vị và/hoặc hương khá giống với kiểu được quan sát thấy cho muối thông thường và do vậy, khi sử dụng tác nhân truyền vị kokumi, kiểu này có thể truyền, cho thực phẩm có hàm lượng muối thấp hoặc tương tự, cảm giác đậm giống vị mặn và đột phá vị ban đầu (hoặc tác động) đến thực phẩm có hàm lượng muối thấp. Do vậy, thực phẩm thu được chứa tác nhân theo sáng chế có thể duy trì cảm giác vị mặn của nó giống như trước khi giảm hàm lượng muối thậm chí khi hàm lượng muối của thực phẩm được giảm và do vậy, tác nhân theo sáng chế cho phép tạo ra thực phẩm có lợi cho sức khỏe. Các ví dụ về thực phẩm này bao gồm các loại xúp và các loại nước xốt khác nhau. Cụ thể, nếu dùng thực phẩm chứa tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế, người tiêu dùng có thể cảm nhận được cảm giác đậm giống vị mặn và đột phá vị ban đầu (hoặc tác động) ngay sau khi ăn thực phẩm này.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 thể hiện biên dạng vị và vị ngon (kiểu phát triển vị) thu được đối với tác nhân truyền vị kokumi của kiểu phát triển vị kiểu vị ban đầu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế chứa γ -Glu-Abu và có thể về cơ

bản tác nhân bao gồm γ -Glu-Abu xét về quan điểm vị và do vậy, tác nhân này có thể còn chứa các thành phần khác ở mức mà chúng không gây ra bất kỳ ảnh hưởng nào đến tác nhân theo sáng chế xét về vị của nó.

Tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế hoặc γ -Glu-Abu cũng có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với ít nhất một thành phần bổ sung cho gia vị được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin như natri glutamat (MSG), các axit nucleic như inosin monophosphat (IMP), các muối vô cơ như natri clorua, các axit hữu cơ như axit xitric, và các loại dịch chiết nấm men khác nhau để nhờ đó tạo ra chế phẩm gia vị hữu ích mà được cải thiện về vị kokumi, so với các gia vị thu được bằng cách sử dụng các thành phần bổ sung này cho từng gia vị. Khi sử dụng γ -Glu-Abu kết hợp với các thành phần bổ sung nêu trên cho gia vị, nồng độ của chúng có thể được xác định hoặc thiết lập một cách dễ dàng hoặc chính xác bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sau khi tiến hành các sự đánh giá thông qua, ví dụ, thử nghiệm cảm quan.

Chế phẩm gia vị theo sáng chế hoặc gia vị chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng cũng có thể được kết hợp với các thành phần khác cho gia vị để nhờ đó tạo ra các gia vị riêng biệt được ưa chuộng hơn.

Trong sáng chế, thuật ngữ “vị kokumi” có nghĩa là vị mà không thể biểu hiện được bằng năm vị cơ bản hoặc vị ngọt, vị mặn, vị chua, vị đắng và vị umami và cụ thể hơn, có nghĩa là vị này trong đó các vị phụ của các vị cơ bản như vị đậm, vị phát triển (đầy miệng), vị liên tục và vị hài hòa được gia tăng ngoài các vị cơ bản. Ngoài ra, thuật ngữ “truyền vị kokumi” được sử dụng ở đây có nghĩa là năm vị cơ bản được thể hiện bằng vị ngọt, vị mặn, vị chua, vị đắng và vị umami được gia tăng, trong khi các vị phụ của các vị cơ bản như vị đậm, vị phát triển (đầy miệng), vị liên tục và vị hài hòa liên quan đến các vị nêu trên được truyền đồng thời đến đối tượng. Hơn nữa, tác dụng này cũng có thể được gọi là tác dụng gia tăng hương thơm. Do vậy, γ -Glu-Abu đóng vai trò làm tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế cũng có thể được gọi là “tác nhân gia tăng hương vị”. Tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế hoặc γ -Glu-Abu cũng có thể được sử dụng làm chất gia tăng vị ngọt, chất gia tăng vị mặn, chất gia tăng vị chua, chất gia tăng vị đắng hoặc chất gia tăng vị umami. Ngoài ra, vị của thực

phẩm có thể thay đổi theo thời gian sau khi ăn thực phẩm này và vị của thực phẩm sau khi ăn nói chung được gọi là vị ban đầu, vị lúc giữa và dư vị, ngay sau khi dùng thực phẩm. Mặc dù chúng chỉ là khái niệm tương đối, nhưng vị ban đầu, vị lúc giữa và dư vị của đối tượng, nói chung, được định nghĩa là vị cảm thấy trong thời gian kéo dài từ 0 đến 2 giây, từ 2 đến 5 giây và không thấp hơn 5 giây sau khi ăn. Vị trong thời gian kéo dài từ 0 đến 5 giây ở đây được gọi là “vị ban đầu/lúc giữa” và vị đó xuất hiện trong thời gian kéo dài từ 2 đến khoảng 30 giây được gọi là “vị lúc giữa/dư vị” (xem dữ liệu được vẽ đồ thị trên Fig. 1). Về sự đánh giá vị trong trường hợp trong đó vị được chia thành ba nhóm nhỏ, việc này là khó đối với người tham gia đánh giá (người dùng thực phẩm cần được đánh giá) tập trung sự chú ý của họ vào việc đánh giá và thử nghiệm được sử dụng thường xuyên bao gồm sự đánh giá vị trong khi chia nó ra thành hai nhóm nhỏ.

Các tác dụng của chất có hoạt tính CaSR đối với kiểu phát triển vị và vị kokumi có thể được xác nhận bằng phương pháp, ví dụ, thử nghiệm cảm quan của người để đánh giá vị. Ví dụ về thử nghiệm cảm quan của người để đánh giá vị là thử nghiệm được minh họa trong phần các ví dụ của đơn sáng chế này, nhưng thử nghiệm cảm quan để đánh giá vị có thể sử dụng ở đây không chỉ giới hạn ở thử nghiệm đặc trưng này.

Thuật ngữ “CaSR” được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là thụ thể nhạy canxi mà thuộc lớp C của thụ thể xuyên màng 7 lần và được gọi là “thụ thể canxi”. Thuật ngữ “chất chủ vận CaSR” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là chất được liên kết với CaSR nêu trên để nhờ đó hoạt hoá thụ thể. Ngoài ra, thuật ngữ “CaSR hoạt hoá” được sử dụng ở đây có nghĩa là phối tử được liên kết với CaSR để nhờ đó hoạt hoá protein được liên kết với guanin nucleotit và truyền các tín hiệu phát ra từ thụ thể. Hơn nữa, khả năng của chất tạo ra sự liên kết với CaSR để nhờ đó hoạt hoá thụ thể được gọi là “hoạt tính chủ vận CaSR”.

Phương pháp thử nghiệm hợp chất có hoạt tính chủ vận CaSR sẽ được mô tả cụ thể dưới đây, nhưng các bước để thử nghiệm hợp chất nói chung không bị giới hạn ở các bước được mô tả sau đây.

1) Bước bổ sung hợp chất thử nghiệm vào hệ thống đo hoạt tính CaSR

được sử dụng để xác định hoạt tính CaSR và bước xác định hoạt tính CaSR;

2) Bước so sánh hoạt tính CaSR quan sát thấy khi bổ sung chất thử nghiệm vào hệ đo hoạt tính với hoạt tính mà quan sát thấy trước khi bổ sung chất; và

3) Bước chọn chất có hoạt tính chủ vận CaSR khi nó được bổ sung vào hệ đo hoạt tính CaSR.

Quá trình xác định hoạt tính CaSR cũng có thể được thực hiện trong khi sử dụng, ví dụ, hệ đo sử dụng các tế bào có khả năng biểu hiện CaSR. Các tế bào này có thể là các tế bào biểu hiện CaSR nội sinh hoặc các tế bào tái tổ hợp di truyền trong đó gen biểu hiện CaSR được đưa vào từ bên ngoài. Hệ đo hoạt tính CaSR nêu trên không bị giới hạn ở hệ đo bất kỳ miễn là nó cho phép xác định sự liên kết (hoặc phản ứng) giữa chất hoạt hoá CaSR và CaSR, hoặc nó có thể phát ra hoặc cung cấp tín hiệu có thể phát hiện được đáp lại sự hình thành liên kết (hoặc phản ứng) giữa chất hoạt hoá CaSR và CaSR trong các tế bào, khi bổ sung phối tử ngoại bào (chất hoạt hoá) đặc hiệu cho CaSR đến các tế bào nêu trên có khả năng biểu hiện CaSR. Nếu hoạt tính CaSR được phát hiện nhờ phản ứng với chất thử nghiệm, người ta cho rằng chất thử nghiệm thể hiện hoạt tính kích thích CaSR mong muốn.

Ví dụ ưu tiên về CaSR được sử dụng trong bản mô tả này là CaSR của người được mã hoá bởi gen CaSR của người được đăng kí dưới mã số ngân hàng gen NM_000388. Tuy nhiên, theo khía cạnh này, CaSR không bị giới hạn ở protein được mã hoá bởi gen có trình tự của CaSR đã đăng kí và nó có thể là protein bất kỳ có khả năng được mã hoá bởi gen có mức tương đồng trình tự không thấp hơn 60%, tốt hơn là không thấp hơn 80% và tốt hơn nữa là không thấp hơn 90% so với trình tự gen nêu trên, chỉ cần protein được mã hoá bởi gen này có chức năng CaSR. Hơn nữa, chức năng CaSR có thể được đánh giá bằng cách tạo ra các tế bào biểu hiện các gen này và sau đó xác định bất cứ sự thay đổi của dòng điện và/hoặc sự thay đổi về nồng độ ion canxi trong các tế bào được quan sát khi bổ sung canxi vào hệ chứa các tế bào.

Về CaSR nêu trên, nguồn CaSR không bị giới hạn ở một nguồn bất kỳ và có thể là CaSR thu được từ động vật bao gồm chuột nhắt, chuột và chó, ngoài CaSR của người.

Như đã được nêu ở trên, hoạt tính CaSR có thể được xác nhận nhờ sử dụng các tế bào sống có khả năng biểu hiện CaSR hoặc một mảnh của nó, các màng tế bào mà có thể biểu hiện CaSR hoặc một mảnh của nó, hoặc hệ in vitro chứa CaSR hoặc protein dưới dạng một mảnh của nó.

Ví dụ về việc sử dụng các tế bào sống sẽ được đề cập dưới đây, nhưng không có nghĩa là sáng chế bị giới hạn ở ví dụ này.

CaSR được biểu hiện trong các tế bào được nuôi cấy như noãn bào của ếch, tế bào buồng trứng thu được từ chuột đồng, và tế bào thận của bào thai người. Sự biểu hiện của CaSR có thể được thực hiện bằng cách đưa gen CaSR mà đã được đem đi xử lý tách dòng dưới dạng plasmit hoặc ARN bổ trợ thu được bằng cách sử dụng nó làm khuôn mẫu vào trong plasmit có gen ngoại sinh. Thích hợp để phát hiện phản ứng này có thể là phương thức điện sinh lý hoặc chất chỉ thị phát ánh sáng huỳnh quang để phát hiện sự gia tăng nồng độ canxi bất kỳ trong tế bào.

Sự biểu hiện của CaSR được xác nhận ban đầu bởi sự có mặt của đáp ứng bất kỳ quan sát được khi bổ sung canxi hoặc tác nhân hoạt hoá có tính đặc hiệu tương ứng. Cụ thể hơn, thích hợp để sử dụng làm các tế bào mong muốn là các tế bào trong đó dòng điện nội bào được phát hiện khi bổ sung canxi ở nồng độ khoảng 5mM hoặc các tế bào trong đó sự phát tia huỳnh quang được quan sát thấy khi bổ sung chất chỉ thị phát ánh sáng huỳnh quang. Hơn nữa, nồng độ canxi được bổ sung vào tế bào được thay đổi để xác định mức phụ thuộc nồng độ canxi bất kỳ của cường độ của dòng điện nội bào. Sau đó chất thử nghiệm được pha loãng đến nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ M đến 1mM, mức phân tán thu được được bổ sung đến noãn bào hoặc các tế bào nuôi cấy và kết quả là hoạt tính CaSR với sự có mặt của chất thử nghiệm nêu trên được đo để nhờ đó xác định hoạt tính chủ vận CaSR của chất thử nghiệm.

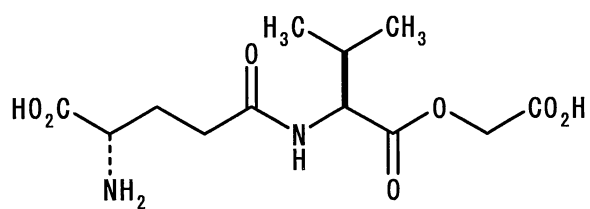
Cụ thể hơn, thích hợp để sử dụng ở đây làm thử nghiệm xác định hoạt tính chủ vận CaSR là, ví dụ, thử nghiệm được mô tả ở phần Ví dụ thử nghiệm được nêu trong bản mô tả này, nhưng thử nghiệm xác định hoạt tính không bị giới hạn ở ví dụ cụ thể này.

Các axit amin hoặc các peptit được sử dụng trong tác nhân truyền vị

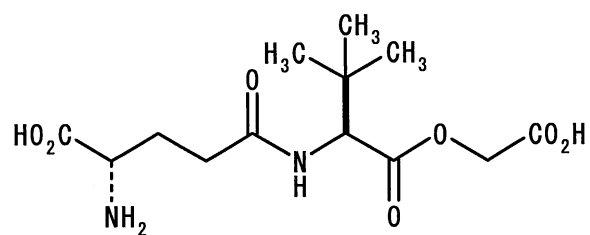
kokumi theo sáng chế ở dạng kết hợp với γ -Glu-Abu bao gồm, ví dụ, một hoặc ít nhất hai axit amin hoặc peptit được chọn từ nhóm bao gồm γ -Glu-Abu và γ -Glu-X-Gly (trong đó X là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin), γ -Glu-Val-Y (trong đó Y là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin), γ -Glu-Ala, γ -Glu-Gly, γ -Glu-Cys, γ -Glu-Met, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Val, γ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, D-Cys, γ -Glu-Met (O), γ -Glu- γ -Glu-Val, γ -Glu-Val-NH₂, γ -Glu-Val-ol, γ -Glu-Ser, γ -Glu-Tau, γ -Glu-Cys (S-Me) (O), γ -Glu-Leu, γ -Glu-Ile, γ -Glu-t-Leu và γ -Glu-Cys (S-Me). Theo khía cạnh này, các axit amin cũng có thể bao gồm, ví dụ, các axit amin trung tính như Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Pro, Hyp, t-Leu; axit amin có tính axit như Asp, Glu; các axit amin có tính kiềm như Lys, Arg, His; các axit amin thơm như Phe, Tyr, Trp; cũng như homoserin, xitruilin, ornithin, axit α -aminobutyric, norvalin, norleuxin, và taurin. Hơn nữa, các axit amin được sử dụng ở đây cũng có thể là các axit amin tổng hợp (có cấu trúc phi protein) như tert-leuxin, xyclo-leuxin, axit α -aminoiso-butyric, L-penixilamin, allothreonin, và allo-isoleuxin. Ngoài ra, trong peptit: γ -Glu-X-Gly, X có thể là axit amin nêu trên hoặc dẫn xuất của nó, nhưng tốt hơn là các axit amin hoặc các dẫn xuất của chúng khác với Cys.

Ngoài ra, các axit amin hoặc các peptit được sử dụng ở dạng kết hợp với γ -Glu-Abu trong tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế có thể là các dẫn xuất peptit mà mỗi dẫn xuất bày có cấu trúc được biểu hiện bằng công thức: $\gamma\gamma$ -Glu-X-OCH-(Z)CO₂H, trong đó X là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin và Z là H (nguyên tử hydro) hoặc CH₃ (nhóm metyl). Hơn nữa, các axit amin hoặc các peptit được sử dụng ở đây cũng có thể là các hợp chất được thể hiện bằng công thức chung nêu trên: γ -Glu-Val-Y trong đó Y là GlyA hoặc LacA. Các ví dụ cụ thể của chúng được ưu tiên là γ -Glu-Val-GlyA, γ -Glu-tLeu-GlyA, γ -Glu-Abu-GlyA, γ -Glu-Val-LacA, γ -Glu-tLeu-LacA và γ -Glu-Abu-LacA. Ngoài ra, thuật ngữ “GlyA” được sử dụng ở đây có nghĩa là axit glycolic và LacA nghĩa là axit butyric. Axit butyric có thể là dạng chất đồng phân S hoặc chất đồng phân R, nhưng tốt hơn là chất đồng phân S. Sau đây là các công thức cấu tạo của các hợp chất này:

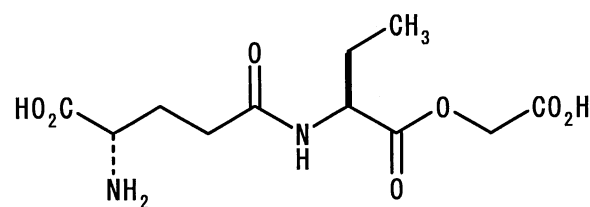
Công thức hoá học 1



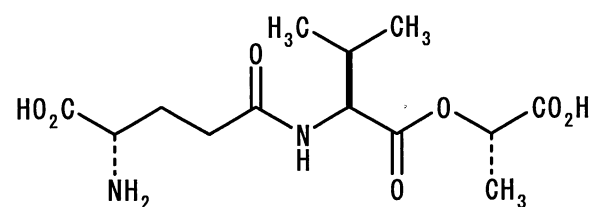
Công thức hoá học 2



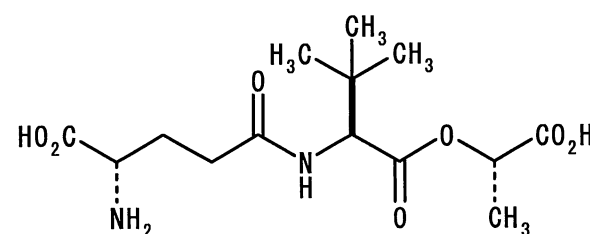
Công thức hoá học 3



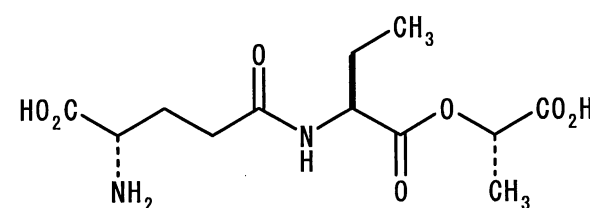
Công thức hoá học 4



Công thức hoá học 5



Công thức hoá học 6



Cụ thể, tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế bao gồm γ -Glu-Abu và tác nhân này có tác dụng truyền vị kokumi kiểu vị ban đầu duy nhất và mỹ mãn và biên dạng phát triển vị như được thể hiện trên Fig. 1. Do vậy, tốt hơn nếu γ -Glu-Abu được sử dụng kết hợp với peptit như γ -Glu-Val-Gly, nó thể hiện biên dạng phát triển vị khác với biên dạng phát triển vị của giải pháp trước đây.

Trong bản mô tả này, mỗi (gốc) axit amin được biểu hiện dưới dạng các chữ viết tắt sau đây:

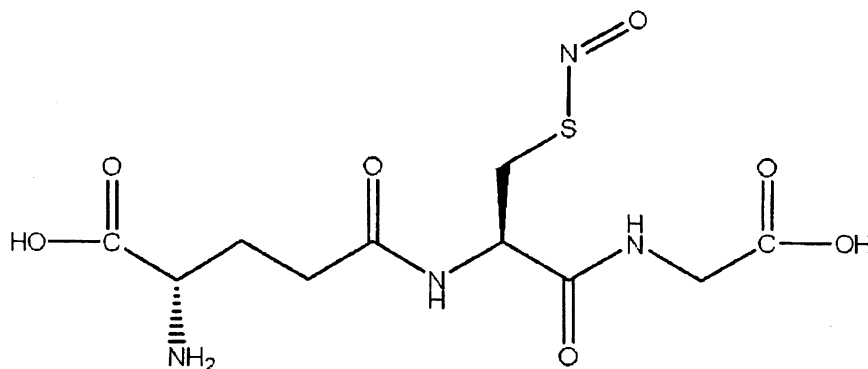
- (1) Gly: glyxin;
- (2) Ala: alanin;
- (3) Val: valin;
- (4) Leu: leuxin;
- (5) Ile: isoleuxin;
- (6) Met: methionin;
- (7) Phe: phenylalanin;
- (8) Tyr: tyrosin;
- (9) Trp: tryptophan;
- (10) His: histidin;
- (11) Lys: lysin;
- (12) Arg: arginin;
- (13) Ser: serin;
- (14) Thr: threonin;
- (15) Asp: axit aspartic;
- (16) Glu: axit glutamic;
- (17) Asn: asparagin;
- (18) Gln: glutamin;
- (19) Cys: xystein;
- (20) Pro: prolin;

- (21) Orn: ornithin;
- (22) Sar: sarcosin;
- (23) Cit: xitruilin;
- (24) N-Val: (hoặc Nva): norvalin (axit 2-aminovaleric);
- (25) N-Leu (hoặc Nle): norleuxin;
- (26) Abu: axit α -aminobutyric;
- (27) Tau: taurin;
- (28) Hyp: hydroxy-prolin;
- (29) t-Leu: tert-leuxin;
- (30) Cle: xyclo-leuxin;
- (31) Aib: axit α -amino-isobutyric (2-metyl-alanin);
- (32) Pen: L-penixilamin;
- (33) allo-Thr: allothreonin;
- (34) allo-Ile: allo-isoleuxin.

Hơn nữa, thuật ngữ “dẫn xuất axit amin” được sử dụng ở đây có nghĩa là các dẫn xuất khác nhau của các axit amin nêu trên và các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm các axit amin đặc trưng và các axit amin tổng hợp, các rượu amino, hoặc các axit amin mà mạch nhánh của nó như các nhóm carboxyl kết thúc, các nhóm amino và/hoặc nhóm thiol của xystein được thế bằng nhiều phần tử thế khác nhau. Các ví dụ về các phần tử thế này bao gồm nhóm alkyl, nhóm axyl, nhóm hydroxyl, nhóm amino, nhóm alkylamino, nhóm nitro, nhóm sulfonyl hoặc nhiều nhóm bảo vệ khác. Như vậy, các ví dụ về các dẫn xuất axit amin bao gồm Arg (NO₂): N- γ -nitro-alginin, Cys (SNO): S-nitro-xystein, Cys (S-Me): S-metyl xystein, Cys (S-aryl): S-aryl xystein, Val-NH₂: valin-amit, và Val-ol: valinol (2-amino-3-metyl-1-butanol). Trong khi đó, peptit: γ -Glu-Cys(SNO)-Gly được sử dụng ở đây là peptit được biểu hiện bằng công thức cấu tạo sau đây và kí hiệu: “(O)” xuất hiện trong các công thức: γ -Glu-Met (O) và γ -Glu-Cys (S-Me) (O) có nghĩa là các peptit này có cấu trúc sulfoxit. Kí hiệu “(γ)” của

γ -Glu có nghĩa là axit amin khác được liên kết với axit glutamic qua nhóm carboxyl nằm ở vị trí γ của axit glutamic.

Công thức hoá học 7



S-Nitrosoglutathion (GNSO)

γ -Glu-Abu được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là axit L- γ -glutamyl-L-2-aminobutyric. γ -Glu-Abu và các axit amin và các peptit được sử dụng ở dạng kết hợp theo sáng chế có thể là thương phẩm nếu chúng có bán trên thị trường, hoặc có thể thu được theo bất kỳ kỹ thuật đã biết như (1) các phương pháp tổng hợp hoá học hoặc (2) phương pháp sử dụng phản ứng enzym, nhưng thuận tiện hơn khi sử dụng phương pháp tổng hợp hoá học. γ -Glu-Abu được sử dụng trong sáng chế có độ dài rất ngắn vì nó chỉ có hai gốc axit amin và do vậy, thuận tiện hơn nếu sử dụng phương pháp tổng hợp hoá học. Cụ thể hơn, nó có thể được sản xuất một cách đơn giản và với chi phí thấp hơn so với tripeptit bất kỳ bao gồm ba gốc axit amin và do vậy, việc sử dụng dipeptit này là khá có lợi xét trên quan điểm sản xuất ở quy mô lớn. Ngoài ra, khi phương pháp tổng hợp hoá học γ -Glu-Abu được sử dụng trong sáng chế và các axit amin và các peptit được sử dụng kết hợp với nhau, quá trình điều chế chúng có thể được thực hiện bằng cách tổng hợp hoặc bán tổng hợp các oligo-peptit này trong khi đồng thời sử dụng thiết bị tổng hợp peptit. Về phương pháp tổng hợp hoá học các peptit này, có thể là, ví dụ, sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn. Peptit được tạo ra như vậy có thể được tinh chế tiếp theo các kỹ thuật thông thường như kỹ thuật sắc ký trao đổi ion, kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao pha nghịch đảo, hoặc kỹ thuật sắc ký ái lực. Kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn và kỹ

thuật tinh chế peptit được sử dụng sau đó là các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

Theo cách khác, khi tạo ra γ -Glu-Abu được sử dụng trong sáng chế và các axit amin và các peptit được sử dụng kết hợp với nhau, đồng thời sử dụng phản ứng enzym, quá trình điều chế chúng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được đề cập trong WO 2004/011653. Cụ thể hơn, chúng có thể được điều chế bằng cách cho axit amin hoặc peptit, trong đó một trong số nhóm carboxyl kết thúc của nó được este hoá hoặc amin hoá, phản ứng với axit amin khác mà có nhóm amino ở trạng thái tự do (ví dụ, axit amin có nhóm carboxyl được bảo vệ) với sự có mặt của enzym tạo ra peptit và sau đó tinh chế dipeptit hoặc tripeptit thu được. Các ví dụ về các enzym tạo ra peptit là các dịch nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản sinh peptit; các tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy; hoặc sản phẩm thu được bằng cách xử lý các tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật, hoặc enzym tạo ra peptit có nguồn gốc từ vi sinh vật. Đồng thời, người ta cho rằng bản mô tả của WO 2004/011653 đã được đề cập trong bản mô tả này.

Ngoài các phương pháp sản xuất nhờ enzym và phương pháp tổng hợp hoá học nêu trên, các peptit được sử dụng trong sáng chế thường có trong các sản phẩm xuất hiện một cách tự nhiên, ví dụ, các thực vật như rau xanh và hoa quả, các vi sinh vật như nấm men và các nguồn tự nhiên khác. Khi các peptit có trong các chất xuất hiện một cách tự nhiên, các peptit này có thể được tách khỏi các chất này và các sản phẩm đã tách thu được cũng có thể được sử dụng trong sáng chế.

Tác nhân truyền vị kokumi hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo sáng chế có thể được sử dụng làm gia vị mà không cần xử lý tiếp hoặc có thể được trộn với các chất mang dùng cho thực phẩm và đồ uống hoặc các thành phần dùng cho các gia vị khác để nhờ đó thu được nhiều loại gia vị khác nhau. Các ví dụ về các thành phần khác dùng cho gia vị bao gồm đồ gia vị, sacarit, chất làm ngọt, chất xơ có thể ăn được, vitamin, các axit amin như natri glutamat (MSG), các axit nucleic như inosin monophosphat (IMP), các muối vô cơ như natri clorua, và các axit hữu cơ như axit xitric hoặc các muối của chúng cũng

như các loại dịch chiết nấm men khác nhau.

Hơn nữa, các thực phẩm có hàm lượng muối thấp được ưu tiên là các thực phẩm chứa tác nhân truyền vị kokumi hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo sáng chế là, về cơ bản, thực phẩm chứa muối thường và, cụ thể, các thực phẩm có hàm lượng muối được giảm. Thực phẩm có hàm lượng muối thấp bao gồm không chỉ các thực phẩm ở dạng rắn, mà còn có các thực phẩm ở dạng lỏng, và thuật ngữ “thực phẩm có hàm lượng muối thấp” có cùng nghĩa với “thực phẩm và đồ uống có hàm lượng muối thấp”.

Các ví dụ về các thực phẩm có hàm lượng muối thấp này bao gồm các sản phẩm từ bơ sữa như bơ và pho mát; các thực phẩm chứa chất béo và dầu động vật và/hoặc chứa chất béo và dầu thực vật như bơ thực vật, nước xốt và bột đảo bơ; thực phẩm được nhũ hoá như nước sốt và sốt mayone; các loại cà ri và món hầm; các loại thực phẩm ăn nhẹ; và các loại súp chứa dịch chiết thịt hoặc làm từ thịt và/hoặc kem. Hơn nữa, các thực phẩm có hàm lượng muối thấp còn bao gồm, ví dụ, thực phẩm lên men hoặc ủ như nước sốt miso và xì dầu; các loại súp hoặc nước cốt và nước xốt mà bắt buộc sử dụng thực phẩm lên men hoặc ủ; các loại thực phẩm được chế biến từ thực vật như các món rau củ ướp muối và ngâm muối; các sản phẩm chế biến từ thịt như thịt giăm bông và xúc xích; các sản phẩm biển được chế biến như patê làm từ cá, các sản phẩm từ biển được sấy khô và thực phẩm được đun trong nước tương; món thịt viên, món thịt hambơ; thực phẩm nướng; và gà nướng. Trong số các thực phẩm này, các thực phẩm có hàm lượng muối thấp được ưu tiên là thực phẩm có nồng độ muối bình thường, trong khi ăn các thực phẩm này, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng. Hơn nữa, tốt hơn là ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm axit hữu cơ như axit lactic, axit citric, axit malic và axit succinic, và các muối của chúng kết hợp với muối thường, ở lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng. Sử dụng các thành phần này ở dạng kết hợp cho phép cải thiện hơn nữa hiệu quả gia tăng vị mặn của tác nhân truyền vị kokumi hoặc γ -Glu-Abu theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống chứa γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng và muối thường với lượng nằm

trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng. Theo khía cạnh này, tốt hơn là, thực phẩm hoặc đồ uống còn chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm axit hữu cơ như axit lactic, axit citric, axit malic và axit succinic, và các muối của chúng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng.

Nếu tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế được kết hợp vào trong thực phẩm có hàm lượng muối thấp, thực phẩm này có thể tạo ra cảm giác đậm giống vị mặn và đột phá vị ban đầu (hoặc tác động) ở giai đoạn ban đầu cho người dùng, khi họ sử dụng thực phẩm có hàm lượng muối thấp này.

γ -Glu-Abu được sử dụng trong sáng chế và các axit amin hoặc các peptit được sử dụng kết hợp với nhau có thể còn bao gồm các thành phần ở dạng muối của chúng. Nếu γ -Glu-Abu được sử dụng trong sáng chế và các axit amin hoặc các peptit được sử dụng kết hợp với nhau có mặt ở dạng muối của chúng, các muối này không bị giới hạn cụ thể ở các muối chấp nhận được về mặt dược lý và các ví dụ cụ thể về các muối này bao gồm các muối amoni, các muối với các kim loại kiềm như natri và kali, các muối với kim loại kiềm thổ như canxi và magie, các muối nhôm, các muối kẽm, các muối với các amin hữu cơ như triethylamin, etanolamin, morpholin, pyrrolidin, piperidin, piperazin và dicyclo-hexylamin, và các muối với các axit amin có tính kiềm như arginin và lysin, cho các nhóm axit như các nhóm carboxyl. Hơn nữa, các ví dụ về các hợp chất được kể đến còn bao gồm các muối với các axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit nitric và axit bromhydric; các muối với các axit hữu cơ như axit axetic, axit citric, axit benzoic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit succinic, axit tannic, axit butyric, axit hibenzoic, axit pantoic, axit enantioc, axit decanoic, axit theoclic, axit salixylic, axit lactic, axit oxalic, axit mandelic và axit malic; và các muối với các axit sulfonic hữu cơ như axit metansulfonic, axit benzensulfonic và axit p-toluensulfonic, cho các nhóm bazơ của các hợp chất này.

Tác nhân truyền vị kokumi hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ như bột khô, bột nhão, và dung dịch, mà không bị giới hạn bất kỳ về các đặc tính vật lý của nó.

Tác nhân truyền vị kokumi hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo

sáng chế có thể được sử dụng để kết hợp vào trong, ví dụ, thực phẩm, đồ uống và gia vị.

Nếu tác nhân truyền vị kokumi hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo sáng chế được sử dụng để kết hợp vào trong, ví dụ, thực phẩm, đồ uống và gia vị, lượng sau cùng của γ -Glu-Abu và của axit amin hoặc peptit được sử dụng ở dạng kết hợp với nhau không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng có thể đảm bảo đạt được các hiệu quả mong muốn theo sáng chế, nhưng lượng γ -Glu-Abu và/hoặc axit amin hoặc peptit đều nằm trong khoảng từ khoảng 1ppb khối lượng đến 99,9% khối lượng và tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10ppb khối lượng đến 10% khối lượng và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ khoảng 1ppm khối lượng đến 1% khối lượng tính theo tổng khối lượng của mỗi loại thực phẩm, đồ uống, gia vị tương ứng hoặc các sản phẩm tương tự khác.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế còn đề xuất phương pháp chế biến gia vị mà bao gồm bước trộn tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế với chất mang chấp nhận được cho các thành phần dùng cho gia vị hoặc thực phẩm và đồ uống khác. Nồng độ của γ -Glu-Abu trong gia vị được chế biến như vậy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng. Cụ thể, phương pháp chế biến gia vị theo sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước trộn tác nhân truyền vị kokumi với các thành phần của gia vị khác và điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong gia vị được sản xuất như vậy đến mức nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà bao gồm bước kết hợp tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế vào trong thành phần dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống khác. Nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm hoặc đồ uống được chế biến như vậy tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng. Do vậy, ở đây ưu tiên bước kết hợp tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế vào trong thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm hoặc đồ uống được chế biến như vậy đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

Thực phẩm, đồ uống, gia vị hoặc tương tự, mà chứa tác nhân truyền vị kokumi đã được kết hợp hoặc tác nhân truyền vị kokumi phức hợp theo sáng chế,

có thể còn chứa, ví dụ, bất kỳ chất mang rắn hoặc lỏng và/hoặc các thành phần gia vị thích hợp, mà dùng được cho thực phẩm và đồ uống.

Về các chất mang được đề cập, có thể kể đến, ví dụ, glucoza, lactoza, sacaroza, tinh bột, manitol, dextrin, glyxerit của axit béo, polyetylen glycol, hydroxyetyl tinh bột, etylen glycol, polyoxyetylen este sorbitan của axit béo, gelatin, albumin, axit amin, nước, và nước muối sinh lý.

Các thành phần nêu trên dùng cho gia vị không bị giới hạn cụ thể và chúng có thể là thành phần bất kỳ đang được sử dụng trong lĩnh vực này, nhưng các ví dụ cụ thể về các thành phần này là các thành phần đã được nêu ở trên.

Hàm lượng của các chất mang được đề cập, các thành phần gia vị khác hoặc tương tự không bị giới hạn cụ thể.

Chế phẩm gia vị theo sáng chế chứa γ -Glu-Abu ở lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, tốt hơn là 2000ppm khối lượng và tốt hơn nữa là 2500ppm khối lượng. Gia vị đặc biệt thích hợp thể hiện tác dụng truyền vị của γ -Glu-Abu. Tỷ lệ của γ -Glu-Abu có trong chế phẩm gia vị theo sáng chế tốt hơn là không thấp hơn 3000ppm khối lượng, tốt hơn nữa là 5000ppm khối lượng, tốt hơn nữa là không thấp hơn 1% khối lượng, tốt nhất là không thấp hơn 3% khối lượng. Hơn nữa, còn được ưu tiên bao gồm gia vị có hàm lượng γ -Glu-Abu không cao hơn 99,9% khối lượng. Các thành phần của chế phẩm gia vị theo sáng chế khác với γ -Glu-Abu không bị giới hạn cụ thể và các ví dụ cụ thể về các thành phần này bao gồm chất mang và các thành phần gia vị, mà dùng được cho thực phẩm và đồ uống.

Các ví dụ cụ thể hơn về gia vị theo sáng chế là dịch chiết nấm men chứa γ -Glu-Abu ở lượng không thấp hơn 2500ppm khối lượng. Dịch chiết nấm men không bị giới hạn cụ thể ở bất kỳ các tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật, từ đó phân chiết thu được, các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật và các phương pháp chiết và do đó, dịch chiết nấm men bất kỳ có thể được sử dụng trong gia vị theo sáng chế. Ngoài ra, các dịch chiết nấm men này có thể là dịch chiết nấm men đã được đem đi, ví dụ, xử lý nhiệt, xử lý bằng enzyme, xử lý nồng độ và/hoặc xử lý để chuyển hoá dịch chiết này thành dạng bột. Phương pháp chế biến dịch chiết nấm men chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 2500ppm khối lượng không bị

giới hạn cụ thể, nhưng sản phẩm dịch chiết nấm men có thể thu được bằng cách, ví dụ, bổ sung γ -Glu-Abu vào dịch chiết nấm men theo cách mà nồng độ của chất trước đó nằm trong khoảng nêu trên.

Chế phẩm gia vị theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ và có thể ở dạng, ví dụ, bột khô, bột nhão và dung dịch, mà không có giới hạn bất kỳ về các đặc tính vật lý.

Chế phẩm gia vị theo sáng chế có thể được sử dụng để kết hợp vào trong, ví dụ, thực phẩm và đồ uống.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chế biến kiểu chế phẩm gia vị khác, phương pháp này bao gồm bước bổ sung gia vị theo sáng chế vào các thành phần gia vị khác hoặc chất mang dùng được cho thực phẩm và đồ uống. Nồng độ của γ -Glu-Abu trong chế phẩm gia vị được điều chế theo phương pháp này tốt nhất là nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng. Cụ thể, phương pháp chế biến kiểu chế phẩm gia vị này theo sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước trộn gia vị theo sáng chế với các thành phần gia vị khác và sau đó điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong kiểu chế phẩm gia vị được điều chế như vậy đến mức nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà bao gồm bước kết hợp chế phẩm gia vị theo sáng chế vào trong các thành phần khác được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống. Nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm hoặc đồ uống được chế biến như vậy tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng. Cụ thể, tốt hơn là bước kết hợp gia vị theo sáng chế vào trong các thành phần khác được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm hoặc đồ uống được chế biến như vậy đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chế biến, ví dụ, thực phẩm, đồ uống hoặc gia vị, mà bao gồm bước bổ sung, vào sản phẩm trung gian được sử dụng cho quá trình sản xuất, ví dụ, thực phẩm, đồ uống hoặc gia vị, γ -Glu-Abu theo cách mà thực phẩm, đồ uống hoặc gia vị thu được chứa γ -Glu-Abu ở lượng nằm trong khoảng từ 1ppb khối lượng đến 99,9% khối lượng. Theo khía cạnh này, tốt

hơn là thực phẩm, đồ uống, gia vị hoặc các sản phẩm tương tự khác là thực phẩm có hàm lượng muối thấp.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà bao gồm bước kết hợp gia vị theo sáng chế vào trong sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống. Hơn nữa, tốt hơn là, thực phẩm hoặc đồ uống là thực phẩm có hàm lượng muối thấp.

Trong phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế, người ta cũng có thể sử dụng, ví dụ, dịch chiết nấm men nêu trên chứa γ -Glu-Abu ở nồng độ cao, làm thành phần được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng và được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống khác. Ngoài ra, có thể được sử dụng ở đây làm các thành phần này còn bao gồm, ví dụ, các sản phẩm γ -Glu-Abu được điều chế theo phương pháp tổng hợp hoá học hoặc enzym và sau đó được tách; hoặc sản phẩm được pha loãng và/hoặc phân tán của các sản phẩm γ -Glu-Abu thu được được tách như vậy. Các ví dụ về các sản phẩm pha loãng và/hoặc phân tán chứa γ -Glu-Abu bao gồm các sản phẩm thu được bằng cách pha loãng sản phẩm dạng bột của γ -Glu-Abu với chất mang rắn hoặc lỏng bất kỳ có thể dùng được cho thực phẩm và đồ uống, mà đã được nêu ở trên.

Theo sáng chế, cụm từ “các thành phần được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống khác” ở đây bao gồm tất cả các loại của các thành phần dùng cho thực phẩm và đồ uống hiện được sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm và đồ uống trừ “các thành phần dùng cho thực phẩm và đồ uống chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng” và các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm các thành phần được nêu dưới đây dưới dạng thực phẩm và đồ uống và sản phẩm trung gian để chế biến, ngoài chất mang và các thành phần dùng cho gia vị nêu trên, mà dùng được cho thực phẩm và đồ uống.

Phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống hoặc sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể bao gồm bước xử lý tiếp hoặc chế biến hỗn hợp của các thành phần dùng cho thực

phẩm và đồ uống, mà thu được nhờ bước kết hợp thành phần dùng cho thực phẩm và đồ uống chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng vào trong các thành phần khác dùng cho thực phẩm và đồ uống. Theo khía cạnh này, thuật ngữ “xử lý hoặc chế biến” được sử dụng ở đây bao gồm bước chế biến bất kỳ thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các ví dụ về các bước chế biến này bao gồm các bước quay, nướng hoặc rán, luộc, chiên, đun cách thủy, cắt, nghiền hoặc đập, nạo, chà xát và nạo, nghiền, xay và nghiền, băm, trộn, giã và giã, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở các bước chế biến này.

Các ví dụ về thực phẩm và đồ uống hoặc sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm và đồ uống, có thể được chế biến theo phương pháp theo sáng chế, bao gồm các thực phẩm hoặc đồ uống đã nêu ở trên, ví dụ, các sản phẩm làm từ bơ sữa như bơ và pho mát; thực phẩm chứa chất béo và dầu từ động vật và/hoặc chất béo và dầu từ thực vật như bơ thực vật, nước xốt và bột đảo bơ; thực phẩm nhũ hoá như nước sốt và sốt mayone; các loại cà ri và món hầm; các loại thực phẩm ăn nhẹ; và các loại súp chứa dịch chiết thịt hoặc làm từ thịt và/hoặc kem. Ngoài ra, thực phẩm và đồ uống này hoặc các sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm và đồ uống cũng bao gồm, ví dụ, thực phẩm lên men hoặc ủ như nước sốt miso và xì dầu; các loại súp hoặc nước cốt và nước xốt mà bắt buộc sử dụng thực phẩm lên men hoặc ủ này; các loại thực phẩm được chế biến từ thực vật như các món rau củ ướp muối và ngâm muối; các sản phẩm chế biến từ thịt như thịt giăm bông và xúc xích; các sản phẩm biển được chế biến như patê làm từ cá, các sản phẩm từ biển được sấy khô và thực phẩm được đun trong nước tương; thịt viên và thịt hamburger; thực phẩm nướng; và gà nướng.

Thực phẩm và đồ uống theo sáng chế còn bao gồm thực phẩm hoặc đồ uống dưới dạng các thành phẩm ở các dạng mà chúng hiện được bán trên thị trường và có thể ăn được và thuật ngữ “các sản phẩm trung gian dùng để chế biến thực phẩm và đồ uống” được dùng ở đây có nghĩa là tất cả các thành phần có dạng bất kỳ trước khi chế biến chúng thành các thành phẩm. Khi sử dụng sản phẩm trung gian dùng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống làm thành phần gia vị chứa γ -Glu-Abu, tốt hơn là sản phẩm trung gian bao gồm γ -Glu-Abu ở lượng

nằm trong khoảng từ khoảng 400 đến 500.000ppm khối lượng, và tốt hơn là từ khoảng 4000 đến 40.000ppm khối lượng và sản phẩm trung gian có thể được điều chế bằng cách bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm và đồ uống chứa, ví dụ, γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng theo cách mà sản phẩm trung gian thu được có nồng độ nằm trong khoảng nêu trên. Theo cách khác, sản phẩm cuối hoặc sản phẩm hoàn chỉnh tốt hơn là bao gồm γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến 200ppm khối lượng như được biểu hiện xét về nồng độ ở thời điểm dùng chúng hoặc nồng độ của chúng trong thực phẩm hoặc đồ uống dưới dạng sản phẩm cuối và sản phẩm cuối này có thể được chế biến bằng cách bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm và đồ uống chứa, ví dụ, γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng theo cách mà sản phẩm cuối thu được có nồng độ nằm trong đã khoảng nêu trên.

Trong phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống hoặc sản phẩm trung gian dùng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, theo sáng chế, bước bổ sung thành phần dùng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà chứa γ -Glu-Abu vào thành phần để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống khác, tốt hơn là bao gồm bước kiểm soát nồng độ của γ -Glu-Abu trong sản phẩm trung gian thu được đến mức nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng, và phương pháp theo sáng chế tốt hơn nữa là bao gồm bước bổ sung sản phẩm trung gian dùng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống vào thành phần dùng để chế biến thực phẩm và đồ uống khác để nhờ đó điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm thu được hoặc đồ uống đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

Trong phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế, bước bổ sung thành phần dùng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống, mà chứa γ -Glu-Abu, vào thành phần để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống khác tốt hơn là bao gồm bước kiểm soát nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm thu được hoặc đồ uống đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

Phương pháp chế biến thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế thích hợp cho các trường hợp trong đó thực phẩm hoặc đồ uống là thực phẩm hoặc đồ uống có hàm lượng muối thấp. Trong trường hợp này, tốt hơn là phương pháp

bao gồm bước bổ sung, vào thành phần cho thực phẩm hoặc đồ uống, ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các axit hữu cơ như axit lactic, axit xitric, axit malic và axit succinic, và các muối của chúng, và tốt hơn là axit lactic và axit malic theo cách mà nồng độ của chúng trong thực phẩm thu được hoặc đồ uống nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng, và tốt hơn là phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung muối thường vào thành phần dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống ở lượng nhỏ hơn lượng muối quan sát thấy khi chế biến thực phẩm hoặc đồ uống tương ứng hiện có. Theo khía cạnh này, thuật ngữ “lượng nhỏ của muối thường trong thực phẩm có hàm lượng muối thấp” được sử dụng ở đây nghĩa là nồng độ muối thường trong thực phẩm có hàm lượng muối thấp, thấp hơn ít nhất 5% và tốt hơn là ít nhất 10% so với lượng muối có trong thực phẩm hoặc đồ uống tương ứng hiện có.

Thực phẩm và đồ uống theo sáng chế có thể là dạng hoặc được tạo ra dưới dạng bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm và đồ uống, ví dụ, các sản phẩm được đóng gói trong vật chứa có dạng bình cổ cong, đóng hộp và đóng chai, hoặc ở dạng các sản phẩm khô.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ cụ thể này.

Điều chế các mẫu khác nhau:

Bốn chất sau đây có bán trên thị trường: γ -L-Glu-L-Abu (Abu: axit α -aminobutyric; bán tại Bachem Feinchemikalien AG); γ -L-Glu-L-Ala (bán tại Bachem Feinchemikalien AG); γ -L-Glu-L-Cys (bán tại Sigma Aldrich Japan Co., Ltd.); và γ -L-Glu-L-Thr (bán tại KOKUSAN Chemical Co., Ltd).

Tổng hợp L-Glu-L-Val:

Bước 1: Hòa tan Z-L-Glu-OBzl (α -benzyl este của axit N- α -carbobenzoxy-L-glutamic, 7,619g, 20,51mM) và Val-OBzl $\cdot$ HCl (L-valin benzyl este hydroclorua, 5g, 20,51mM) trong metylen clorua (100mL), và dung dịch thu được được giữ ở 0°C. Sau đó, trietylamin (3,2mL, 22,57mM), HOBt (1-hydroxybenzo-triazol, 3,053g, 22,57mM) và WSC $\cdot$ HCl (1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)

carbodiimid hydroclorua, 4,326g, 22,57mM) được bổ sung vào dung dịch này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Chất lỏng phản ứng sau đó được cô dưới áp suất giảm và phần cặn thu được được hoà tan trong ethyl axetat (220mL). Dung dịch được cất phân đoạn với dung dịch axit xitric 5% (100mL) và pha nước thu được như vậy được chiết tiếp với ethyl axetat (60mL). Các pha hữu cơ được kết hợp và sau đó rửa lần lượt với dung dịch muối đã bão hoà (80mL), dung dịch 5% của natri hydro carbonat (80mL) và dung dịch muối đã bão hoà (80mL). Pha hữu cơ thu được như vậy được làm khô trên magie sulfat khan, sau đó được lấy ra bằng cách lọc và phần lọc thu được được cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được rửa với hỗn hợp ethyl axetat/n-hexan (1:1) trong khi duy trì phần cặn này ở trạng thái huyền phù đặc và sau đó được lọc để thu lấy Z-L-Glu-L-Val-OBzl (10,0273g). Hơn nữa, tinh thể kết tủa từ phần chiết ethyl axetat/n-hexan thu được bằng cách bổ sung n-hexan được thu gom và sau đó tái kết tinh từ ethyl axetat/n-hexan để nhờ đó thu gom Z-L-Glu-L-Val-OBzl (1,0399g).

Hiệu suất: 94,25%.

Bước 2: Bổ sung Z-L-Glu-L-Val-OBzl (11,71g, 20,86mM) vào etanol (160mL), tiếp theo hỗn hợp thu được được bổ sung paladi 10% trên cacbon (2,3g) và nước (10mL) và hệ phản ứng thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm trong môi trường khí hydro. Nước (100mL) được bổ sung vào hệ này ở các phần nhỏ trong khi phản ứng. Paladi trên cacbon được loại bỏ bằng cách lọc, phần lọc thu được được cô dưới áp suất giảm, phần cặn thu được từ đó được tái kết tinh từ một lượng nhỏ nước và etanol để nhờ đó thu được γ -L-Glu-L-Val (5,0g).

Hiệu suất: 97,23%.

Các tính chất đặc trưng của sản phẩm thu được là như sau:

ESI-MS: m/z 247,2 ($M+H$)⁺

¹H-NMR(400MHz, D₂O): δ (ppm): 0,86 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,88 (3H, d, J = 6,8 Hz), 2,04-2,13 (3H, m), 2,42-2,46 (2H, m), 3,74 (1H, t, J=6,3 Hz), 4,13 (1H, d, J=5,8Hz).

Điều chế γ -L-Glu-L-Ser:

Theo các quy trình giống như được sử dụng trong quy trình điều chế γ -L-Glu-L-Val nêu trên, γ -L-Glu-L-Ser được tổng hợp bằng cách sử dụng Z-L-Glu-OBzl và L-Ser-OBzl làm nguyên liệu khởi đầu. Các tính chất đặc trưng của sản phẩm thu được là như sau:

ESI-MS: m/z 235,1 ($M+H$)⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm): 1,98-2,09 (2H, m), 2,40 (2H, t, $J=8,0$ Hz), 3,71-3,81 (3H, m), 4,33 (1H, t, $J=8,0$ Hz).

Điều chế γ -L-Glu-L-t-Leu:

Theo các quy trình giống như được sử dụng trong quy trình điều chế γ -L-Glu-L-Val nêu trên, γ -L-Glu-L-t-Leu được tổng hợp bằng cách sử dụng Z-L-Glu-OBzl và L-t-Leu-OBzl làm nguyên liệu khởi đầu. Các tính chất đặc trưng của sản phẩm thu được là như sau:

ESI-MS: m/z 261,3 ($M+H$)⁺

Điều chế γ -L-Glu-Aib:

Theo các quy trình giống như được sử dụng trong quy trình điều chế γ -L-Glu-L-Val nêu trên, γ -L-Glu-Aib được tổng hợp bằng cách sử dụng Z-L-Glu-OBzl và Aib-Ot-Bu làm nguyên liệu khởi đầu. Các tính chất đặc trưng của sản phẩm thu được là như sau:

ESI-MS: m/z 233,3 ($M+H$)⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm): 1,36 (6H, s), 2,00-2,06 (2H, m), 2,30-2,34 (2H, m), 3,69 (1H, t, $J=6,2$ Hz).

Ví dụ thử nghiệm 1: Điều chế plasmit biểu hiện CaSR

Plasmit biểu hiện CaSR được điều chế theo quy trình sau đây:

Tổng hợp oligo ADN tổng hợp được sử dụng cho các quá trình PCR (tức là, đoạn xuôi (SEQ ID NO. 3: ACTAATACGAC TCACTATAGGGACCATGGCA-TTTTATAGCTGCTGCTGG) và đoạn ngược (SEQ ID NO. 4: TTATGAATT-CACTACGTTTTCTGTAAACAG) trên cơ sở trình tự ADN được đăng kí ở NCBI (CaSR (thụ thể canxi): NM_000388, các

SEQ ID NO. 1 và 2).

Các quá trình PCR được thực hiện dưới các điều kiện được nêu dưới đây sử dụng ADN bổ trợ (bán tại Clontech Company) có nguồn gốc từ thận của người làm nguyên liệu, bằng cách sử dụng các đoạn mồi nêu trên và Pfu Ultra ADN Polymeraza (Pfu Ultra DNA Polymerase, bán tại Stratagene Company): Hệ phản ứng được xử lý ở 94°C trong 3 phút và sau đó ở 94°C trong 30 giây, ở 55°C trong 30 giây và ở 72°C trong 2 phút, trong đó các bước này được lặp lại 35 lần và hệ này được cho phản ứng sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Hệ phản ứng sau đó được đem đi xử lý điện di qua nền agarosa, agarosa được nhuộm bằng tác nhân nhuộm ADN và sau đó nó được chiếu tia UV để phát hiện xem ADN bổ trợ có chắc chắn được khuếch đại trong quá trình PCR hay không. Đồng thời, mẫu điện di được so sánh với gen đánh dấu ADN mà có phạm vi điện di đã được biết để xác nhận độ dài chuỗi của các sản phẩm PCR.

Vector plasmit pBR322 được cắt bằng enzym giới hạn EcoRV (bán tại Takara Co., Ltd) và đoạn gen này được khuếch đại bằng các quá trình PCR được được gắn với vector plasmit ở vị trí cắt, sử dụng Ligation Kit (bán tại Promega Company). Các tế bào của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với dung dịch phản ứng này, sau đó chọn các thể biến nạp chứa plasmit trong đó sản phẩm được khuếch đại PCR đã được nhân dòng và tiếp theo, sản phẩm được khuếch đại bằng PCR được xác nhận bằng cách phân tích trình tự bazơ ADN.

Plasmit tái tổ hợp này được sử dụng để hình thành plasmit biểu hiện CaSR hCaSR/pcDNA3.1 của người.

Ví dụ thử nghiệm 2: Đánh giá hoạt tính chủ vận CaSR

Các tế bào 293E (các tế bào HEK293 biểu hiện EBNA1, ATCC No. CRL-10852) được nuôi cấy trong môi trường DMEN/Ham's-F12 (3,15/mL môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco chứa glucoza, bán tại Nakaraitesk Company) được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê, với sự có mặt của 200µg/mL G418 (bán tại Genetisin). Các tế bào được nuôi cấy được ủ trong bình F25 ở mật độ 3×10^6 tế bào/10mL, bình này được để yên trong 24 giờ trong buồng ủ CO₂ (5% CO₂, 37°C), và sau đó plasmit biểu hiện CaSR hCaSR/pcDNA3.1 của người được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với chất phản

ứng để chuyển nhiễm Eugene6 (bán tại Roche Company). Plasmit được chuyển nhiễm được giữ trong buồng ủ CO₂ trong 6 đến 7 giờ, sau đó các tế bào được thu gom bằng cách sử dụng môi trường DMEM/Ham's-F12 chứa 10% huyết thanh bào thai bê và các tế bào được ủ trong từng lỗ của đĩa có 96 lỗ được phủ poly-D-lysin (BD-Biocoat) ở mật độ 70.000 tế bào/lỗ.

Đĩa có 96 lỗ được để lắng trong 24 giờ trong buồng ủ CO₂, sau đó môi trường nuôi cấy được loại bỏ khỏi từng lỗ của đĩa có 96 lỗ trong đó các tế bào được ủ, sau đó bổ sung vào từng lỗ chất chỉ thị Ca²⁺ phát ánh sáng huỳnh quang Calcium 4 Assay Kit (bán tại Molecular Devices Company) được hoà tan trong dung dịch đệm thử nghiệm (Assay Buffer) (chứa 146mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 1mg/mL glucoza, 20mM HEPES (độ pH = 7,2) và 0,75 đến 1,25mM CaCl₂) ở lượng 200µl/lỗ, và sau đó đĩa có 96 lỗ được để lắng ở nhiệt độ 37°C trong một giờ và tiếp theo là ở nhiệt độ phòng trong 10 phút sao cho chất chỉ thị hoà vào trong các tế bào.

Từng lỗ của đĩa có 96 lỗ được bổ sung từng hợp chất thử nghiệm được hoà tan trong dung dịch đệm thử nghiệm chứa 0,1% BSA ở lượng 50µl/lỗ và sau đó bất kỳ sự thay đổi về cường độ của ánh sáng huỳnh quang được thu lại trong 3 phút sử dụng FLEX Station (bán tại Molecular Devices Company).

Phương pháp xác định EC₅₀:

Mức chênh lệch (RFU (Max-Min)) giữa các cường độ huỳnh quang lớn nhất và nhỏ nhất được quan sát thấy ở từng lỗ trước và sau khi bổ sung hợp chất thử nghiệm được xác định bằng phép tính tự động nhờ sử dụng FLEX Station. Tỷ lệ hoạt tính được tính trong khi giá trị RFU (Max-Min) được phát hiện khi bổ sung hợp chất ở nồng độ cực đại được coi là 100% và giá trị RFU (Max-Min) phát hiện thấy khi sử dụng dung dịch đệm thử nghiệm chứa 0,1% BSA không có bất kỳ hợp chất thử nghiệm được coi là 0%, sau đó dữ liệu thu được được đem đi xử lý bằng quy trình làm khớp với đường cong sử dụng phần mềm bảng tính Xfit hoặc Graph-Pad-Prism để nhờ đó xác định EC₅₀ mà là nồng độ của hợp chất ở tỷ lệ hoạt tính 50%. Các kết quả thu được như trên được thể hiện trong Bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Hợp chất	EC ₅₀ , μ M
γ -Glu-Abu	0,21
γ -Glu-Ala	1,24
γ -Glu-Val	1,03
γ -Glu-tLeu	3,06
γ -Glu-Cys	0,16
γ -Glu-Ser	11
γ -Glu-Thr	6,97
γ -Glu-Aib	15,4

Khi so sánh với các dipeptit khác, γ -Glu-Abu được nhận thấy có hoạt tính chủ vận CaSR mạnh có thể so được với hoạt tính được quan sát thấy đối với γ -Glu-Cys. Đã biết rằng peptit có trọng lượng phân tử thấp có hoạt tính chủ vận CaSR hữu ích để làm tác nhân truyền vị kokumi (xem tài liệu sáng chế 1 nêu trên) và do vậy, người ra cho rằng γ -Glu-Abu sẽ có thể là tác nhân truyền vị kokumi đặc biệt tốt.

Ví dụ 1: Đánh giá hoạt tính truyền vị kokumi

Trong ví dụ này, γ -Glu-Abu được đánh giá về cường độ của hoạt tính truyền vị kokumi của nó theo thử nghiệm đánh giá cảm quan định lượng.

Thử nghiệm đánh giá cảm quan định lượng này được thực hiện theo quy trình sau đây: Cường độ của hoạt tính truyền vị kokumi được phát hiện thấy của từng hợp chất thử nghiệm được xác định là giá trị được phát hiện khi trộn hợp chất thử nghiệm tương ứng ở lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,5g/dL với nước cất chứa natri glutamat (0,05g/dL), inosin monophosphat (0,05g/dL), và natri clorua (0,5g/dL). Tiếp theo, khi mẫu có tính axit khi hoà tan hợp chất thử nghiệm so với mẫu đối chứng không có hợp chất thử nghiệm, độ pH của mẫu được điều chỉnh, bằng cách sử dụng NaOH, đến độ pH (được quan sát thấy cho mẫu đối chứng) $\pm$ 0,2 trước khi sử dụng mẫu trong quá trình đánh giá. Tiêu chuẩn đánh giá được đặt ra là như sau: mẫu đối chứng: 0 điểm; mạnh: 3 điểm; rất

mạnh: 5 điểm, trong khi thử nghiệm được thực hiện sử dụng nhóm người tham gia có n (số người tham gia thử nghiệm) = 4. Hơn nữa, để làm rõ hơn về tiêu chuẩn đánh giá, vị ban đầu và vị lúc giữa/dư vị của γ -Glu-Val-Gly ở nồng độ 0,001g/dL được đặt ở mức 3,0 điểm. Theo khía cạnh này, thuật ngữ “vị lúc giữa/dư vị” có nghĩa là vị được phát hiện thấy trong suốt thời gian kéo dài từ thời gian cảm giác vị lúc giữa và thời gian cảm giác dư vị. Sự chấm điểm hoặc phân loại được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thang chia độ đều và cụ thể hơn, nó được thực hiện bằng cách ghi từng điểm tương ứng lên đường thẳng trên đó các điểm tương ứng với thang -5 ~ 0 ~ 5 đã được chỉ định. Các ứng viên được sử dụng trong thử nghiệm này là những người đã tham gia vào việc phát triển gia vị cho thực phẩm với thời gian không ít hơn một năm và người có thể nhận biết sự khác nhau về độ chuẩn giữa γ -Glu-Cys-Gly và γ -Glu-Val-Gly được bổ sung vào dung dịch có vị umami/mặn gấp khoảng 10 lần (đồng thời xác nhận khả năng của những người này ở các khoảng thời gian đã định). Tác nhân truyền vị kokumi theo sáng chế thể hiện hoạt tính truyền vị kokumi trong khoảng nồng độ của các chất được bổ sung. Các kết quả về nồng độ của các tác nhân thu được như vậy được thể hiện trong bảng 2 sau đây.

Ngoài ra, γ -Glu-Ala cũng được đánh giá về tác dụng truyền vị kokumi của nó theo quy trình giống như quy trình được sử dụng ở trên và các kết quả cũng được thể hiện ở bảng 2. Cả hai tác nhân truyền vị kokumi này là các tác nhân kiểu vị ban đầu mà thể hiện số điểm cao cho vị ban đầu, nhưng trong số đó γ -Glu-Abu được nhận thấy là dipeptit có độ chuẩn cực cao.

Bảng 2

Hợp chất	Nồng độ (g/dL)	Cường độ truyền vị kokumi		Biên độ đánh giá cảm quan
		Vị ban đầu	Vị lúc giữa/dư vị	
γ -Glu-Abu	0,005	3,8	3,2	Độ đậm đà được gia tăng từ giai đoạn vị ban đầu (tạo ra cảm giác hài hoà với vị nguyên vẹn)

γ -Glu-Ala	0,2	4,5	4,3	Hầu hết, vị chua và vị ngọt được gia tăng bắt đầu từ giai đoạn vị ban đầu.
-------------------	-----	-----	-----	--

Theo cách khác, γ -Glu-Cys và các dipeptit khác cũng được đánh giá về cường độ của hoạt tính truyền vị kokumi theo các thử nghiệm đánh giá cảm quan định lượng giống nhau như được sử dụng ở trên. Các kết quả thu được như vậy được thể hiện ở bảng 3 sau đây.

Bảng 3

Hợp chất	Nồng độ (g/dL)	Cường độ truyền vị kokumi		Biên độ đánh giá cảm quan
		Vị ban đầu	Vị lúc giữa/dư vị	
γ -Glu-Cys	0,01	3,1	3,1	Hợp chất này chủ yếu thể hiện các vị lúc giữa và dư vị và gây ra mùi phẳng phất như mùi lưu huỳnh.
γ -Glu-Ser	0,2	3,6	3,0	Hợp chất này thể hiện vị ban đầu mạnh, nhưng gây ra một số vị lạ.
γ -Glu-Val	0,01	3,1	2,4	Hợp chất này thể hiện dư vị khá yếu.

Như vậy, đã nhận thấy rằng γ -Glu-Abu có hoạt tính truyền vị kokumi tuyệt vời và là tuyệt vời khi làm bật ra vị ban đầu theo kiểu phát triển vị hoặc gia vị. Sự làm bật ra vị ban đầu này được nhận thấy ở γ -Glu-Abu là điểm cực kỳ nổi trội so với γ -Glu-Cys. Hơn nữa, γ -Glu-Abu cũng có độ ổn định tuyệt vời và điều này cũng là một lợi thế so với γ -Glu-Cys. Ngoài ra, γ -Glu-Abu có độ dài chuỗi ngắn vì nó chỉ có hai gốc axit amin. Do vậy, nó có thể được điều chế một cách dễ dàng với chi phí thấp so với quá trình điều chế tripeptit bất kỳ có 3 gốc axit amin và do đó, tác nhân theo sáng chế là rất hữu ích xét theo quan điểm quy mô

công nghiệp.

Ví dụ 2: Xác định cường độ của hoạt tính truyền vị kokumi

Cường độ của γ -Glu-Abu được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm xác định điểm đẳng thức chủ quan (PSE - Point of Subjective Equality) theo phương pháp xác định giới hạn (“Statistical Sensory Examination techniques”, tác giả SATO Shin, do Japan Federation of Science and Technology xuất bản).

Trong ví dụ này, sự đánh giá cảm quan được thực hiện như sau: nước cất chứa natri glutamat (0,05g/dL), inosin monophosphat (0,05g/dL) và natri clorua (0,5g/dL) được sử dụng làm dung dịch đánh giá cảm quan. Về dipeptit hiện tại có tác dụng truyền vị kokumi, γ -Glu-Val được sử dụng. Cũng có thể nhận thấy γ -Glu-Cys và γ -Glu-Val có mức tác dụng giống nhau, nhưng chúng không thể hiện rõ vị ban đầu và cho thấy chất lượng vị khác với γ -Glu-Abu. γ -Glu-Ala cho thấy cường độ của tác dụng truyền vị kokumi yếu hơn so với γ -Glu-Val, có vị chua mạnh và nó khó xử lý vì nó cần điều chỉnh độ pH. Tương tự, γ -Glu-Ser thể hiện cường độ của tác dụng truyền vị kokumi yếu hơn so với γ -Glu-Val, nó cũng gây ra các vị lạ và do vậy, nó khó xử lý.

Để xác định nồng độ của γ -Glu-Val có tác dụng phát triển vị hoặc gia vị mà có cường độ giống với dung dịch mà được sử dụng cho thử nghiệm đánh giá cảm quan, bổ sung 0,005g/dL γ -Glu-Abu, các dung dịch chứa γ -Glu-Val được điều chế có nồng độ được thay đổi trên thang logarit 50% bằng cách sử dụng dung dịch được sử dụng cho thử nghiệm đánh giá cảm quan được bổ sung 0,01g/dL γ -Glu-Val làm chuẩn. Nồng độ của γ -Glu-Val thay đổi ở 7 giai đoạn trong khoảng từ 0,0030 đến 0,0337g/dL. Khi mẫu thể hiện tính axit sau khi mỗi hợp chất thử nghiệm được hoà tan trong dung dịch cho thử nghiệm cảm quan, so với độ pH của mẫu đối chứng không có hợp chất thử nghiệm, độ pH của mẫu được điều chỉnh bằng cách sử dụng NaOH, đến mức độ pH (được quan sát thấy cho mẫu đối chứng) $\pm 0,2$, trước khi sử dụng mẫu trong quá trình đánh giá. Có 18 người tham gia thử nghiệm được cho dùng các mẫu dung dịch mà các dung dịch này được sắp xếp theo trình tự tăng dần nồng độ γ -Glu-Val và các thử nghiệm đánh giá được tiếp tục cho đến khi từng người tham gia thử nghiệm nhận xét

rằng dung dịch thử nghiệm có nồng độ cụ thể đã thể hiện tác dụng truyền vị kokumi mạnh hơn so với tác dụng truyền vị kokumi của dung dịch chứa 0,005g/dL γ -Glu-Abu. Sau một thời gian tạm nghỉ, 18 người tham gia thử nghiệm nêu trên lại được cho dùng các dung dịch được sắp xếp theo trình tự giảm dần nồng độ γ -Glu-Val và các thử nghiệm đánh giá được tiến hành liên tục cho đến khi từng người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng dung dịch thử nghiệm có nồng độ cụ thể đã thể hiện tác dụng truyền vị kokumi yếu hơn so với dung dịch chứa 0,005g/dL γ -Glu-Abu.

Trong các thử nghiệm đánh giá cảm quan này, những người mà đã có đầy đủ kinh nghiệm trong quá trình phát triển thực phẩm được sử dụng làm ứng viên tham gia thử nghiệm. Các kết quả thu được trong các thử nghiệm đánh giá này được thể hiện ở Bảng 4 sau đây.

Bảng 4: Số người tham gia thử nghiệm được sử dụng để đánh giá từng nồng độ γ -Glu-Val:

Sự thay đổi về Stimn.	Số người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng tác dụng của γ -Glu-Val là cao hơn so với γ -Glu-Abu (0,0050g/dL) (Số người tham gia thử nghiệm)	Số người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng sự khác nhau về tác dụng giữa γ -Glu-Val và γ -Glu-Abu (0,0050g/dL) là không rõ ràng (Số người tham gia thử nghiệm)	Số người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng tác dụng của γ -Glu-Val là yếu hơn so với γ -Glu-Abu (0,0050g/dL) (Số người tham gia thử nghiệm)
Nồng độ của γ -Glu-Val (g/dL)			
0,0030	0	0	36
0,0044	1	0	35
0,0067	3	13	20
0,0100	11	13	12
0,0150	25	6	5
0,0225	28	7	1

0,0337	36	0	0
--------	----	---	---

Bảng 5: Ngưỡng dưới và ngưỡng trên tại đó từng người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng các mẫu so với mẫu khác có các nồng độ giống nhau

Người tham gia thử nghiệm	Cách thức biểu hiện *	Ngưỡng dưới (ppm)	Ngưỡng trên (ppm)
1	↑	55,5	55,5
2	↑	83,5	83,5
3	↑	55,5	125,0
4	↑	55,5	125,0
5	↑	55,5	125,0
6	↑	125,0	187,5
7	↑	37,0	37,0
8	↑	55,5	125,0
9	↑	55,5	125,0
10	↑	125,0	281,0
11	↑	55,5	55,5
12	↑	55,5	83,5
13	↑	83,5	125,0
14	↑	83,5	83,5
15	↑	125,0	125,0
16	↑	187,5	281,0
17	↑	55,5	281,0
18	↑	83,5	83,5
19	↓	125,0	125,0
20	↓	83,5	125,0
21	↓	187,5	281,0
22	↓	83,5	187,5
23	↓	83,5	83,5
24	↓	55,5	83,5
25	↓	83,5	125,0

26	↓	55,5	281,0
27	↓	55,5	125,0
28	↓	187,5	281,0
29	↓	187,5	187,5
30	↓	55,5	125,0
31	↓	125,0	125,0
32	↓	83,5	125,0
33	↓	56,0	83,5
34	↓	281,0	281,0
35	↓	55,5	83,5
36	↓	125,0	281,0
Vùng tin cậy (trung bình)	--	94,5	149,3
PSE	121,9		

*: Liên quan đến cách thức biểu hiện, ↑ có nghĩa là trình tự tăng dần của nồng độ, và ↓ có nghĩa là trình tự giảm dần của nồng độ.

1) Các trường hợp, trong đó các giá trị ngưỡng dưới và ngưỡng trên là giống nhau, tương ứng với các trường hợp trong đó đã nhận xét rằng sự khác biệt giữa các sự đánh giá “mạnh hơn” và “yếu hơn” là không thể xác định được hoặc trong đó nồng độ γ -Glu-Val không được chỉ ra một cách rõ ràng. Ví dụ, người tham gia thử nghiệm số 1 nhận xét rằng tác dụng mong muốn của γ -Glu-Val là yếu hơn so với γ -Glu-Abu ở nồng độ γ -Glu-Val 44ppm (0,0044g/dL), trong khi anh ta nhận xét rằng tác dụng này mạnh hơn so với γ -Glu-Abu ở nồng độ γ -Glu-Val 67ppm (0,0067g/dL) và do vậy, giá trị ngưỡng dưới (55,5ppm) và giá trị ngưỡng trên (55,5ppm) là giống nhau.

2) “Vùng (hoặc giá trị) tin cậy” được định nghĩa ở đây là mức trung bình của giá trị ngưỡng dưới và giá trị ngưỡng trên.

Điểm chất lượng được đánh giá chủ quan (point of subjective equality-PSE) về γ -Glu-Val tương ứng với 50ppm (0,0050g/dL) γ -Glu-Abu được xác định như sau: (Tổng giá trị tin cậy của giá trị ngưỡng dưới và giá trị ngưỡng trên)÷2.

Nồng độ của γ -Glu-Val (PSE) thể hiện tác dụng mong muốn mà có cường độ giống với cường độ được quan sát thấy cho 0,0050g/0dL γ -Glu-Abu được xác định là khoảng 0,0100g/dL khi xét về số lượng người tham gia thử nghiệm được thể hiện ở bảng 4. Nếu PSE được tính trên cơ sở các giá trị ngưỡng trên và ngưỡng dưới của γ -Glu-Val, tại đó mỗi người tham gia thử nghiệm nhận xét rằng các tác dụng được nhận thấy cho hai dipeptit này là tương đương nhau, giá trị này được nhận thấy là 0,0122g/dL. Hơn nữa, cường độ của tác dụng truyền vị kokumi mong muốn của γ -Glu-Abu được nhận thấy là gấp khoảng 2,4 lần so với γ -Glu-Val và vì vậy, cũng có thể kết luận rằng γ -Glu-Abu là dipeptit có tác dụng truyền vị rất mỹ mãn. Như vậy, γ -Glu-Abu có thể được coi là dipeptit có giá trị mà có thể được điều chế dễ dàng so với các chất đã biết thông thường và nó có thể thể hiện vị kokumi ngay ở giai đoạn vị ban đầu khi được dùng cho nhiều loại thực phẩm.

Ví dụ 3: Đánh giá tác dụng của γ -Glu-Abu đối với sự gia tăng vị mặn

Trong ví dụ này, γ -Glu-Abu được đánh giá về tác dụng gia tăng vị mặn của nó theo các thử nghiệm đánh giá cảm quan định lượng.

Các thử nghiệm đánh giá cảm quan được thực hiện theo các thức sau đây: Hợp chất thử nghiệm ở lượng mà được cho là tối ưu, hợp chất này được bổ sung vào nước cất chứa natri clorua (0,5g/dL) và cường độ của tác dụng gia tăng vị mặn được xác định. Khi mẫu thể hiện trạng thái axit sau khi từng hợp chất thử nghiệm được hoà tan trong dung dịch thử nghiệm cảm quan, khi được so với độ pH của mẫu đối chứng không có hợp chất thử nghiệm, độ pH của mẫu được điều chỉnh, bằng cách sử dụng NaOH, đến độ pH (được quan sát thấy cho mẫu đối chứng) $\pm$ 0,2, trước khi sử dụng mẫu trong quá trình đánh giá.

Về thang điểm đánh giá cảm quan, tác dụng được đánh giá trong khoảng kéo dài từ -5 đến 0 đến 5, với giả thiết rằng mẫu đối chứng không có hợp chất thử nghiệm hoặc dung dịch natri clorua có nồng độ 0,5g/dL được đánh giá có mức điểm 0 và với dung dịch natri clorua có nồng độ 0,75g/dL được đánh giá là có mức điểm 5, trong khi số người tham gia thử nghiệm (n) lập thành từng bảng được thiết lập ở mức 5. Thuật ngữ “vị ban đầu” ở đây nghĩa là cảm giá vị mà từng người tham gia thử nghiệm cảm nhận thấy trong suốt thời gian từ lúc dùng

mẫu cho đến 2 giây sau đó, đồng thời thuật ngữ “vị lúc giữa/dư vị” nghĩa là vị được từng người tham gia thử nghiệm cảm nhận thấy trong thời gian 2 giây lúc ăn, sau khi ăn, hoặc trong suốt thời gian cảm giác vị lúc giữa và thời gian cảm giác dư vị. Sự tính điểm hoặc đánh giá được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật đường chuẩn và cụ thể hơn, nó được thực hiện bằng cách ghi lại từng điểm số tương ứng trên đường thẳng trên đó các điểm tương ứng với $-5 \sim 0 \sim 5$ đã được chỉ định. Người tham gia thử nghiệm được sử dụng trong thử nghiệm này là những người đã tham gia vào sự phát triển gia vị dùng cho thực phẩm không dưới một năm thời gian tích lũy kinh nghiệm và người có thể nhận xét rằng mức chênh lệch về độ chuẩn giữa γ -Glu-Cys-Gly và γ -Glu-Val-Gly là khoảng 10 lần (đồng thời xác nhận khả năng của những người này ở các khoảng thời gian đã định). Các kết quả thu được như vậy được thể hiện ở bảng 6 sau đây.

Bảng 6

Hợp chất	Nồng độ (g/dL)	Mức độ truyền vị mặn		Biên độ đánh giá cảm quan
		Vị ban đầu	Vị lúc giữa/dư vị	
γ -Glu-Abu	0,004	1,6	1,5	Vị mặn gia tăng từ thời điểm vị ban đầu và sự mặn sắc của vị mặn cũng được truyền.
γ -Glu-Val-Gly	0,002	0,8	1,8	Mẫu mất các đặc tính như kiểu vị ban đầu.

Trong ví dụ này, γ -Glu-Val-Gly là tripeptit có độ chuẩn cao xét về khả năng truyền vị kokumi được so sánh với γ -Glu-Abu là dipeptit theo sáng chế. Kết quả là, có thể kết luận rằng γ -Glu-Val-Gly thể hiện cường độ của hoạt tính truyền vị cao hơn so với γ -Glu-Abu, khi xét về nồng độ được sử dụng để đánh giá và điểm số thu được. Như cũng được thể hiện về biên độ đánh giá cảm quan, tuy nhiên, tính cân bằng của vị mặn bị giảm đáng kể trong trường hợp γ -Glu-Val-Gly. Mặt khác, γ -Glu-Abu có thể tăng cường vị mặn theo cách tạo sự cân bằng tốt và do vậy, γ -Glu-Abu có thể là đặc biệt thích hợp để làm peptit tăng cường vị mặn.

Ví dụ 4: Đánh giá hiệu quả của axit hữu cơ được sử dụng ở dạng kết hợp:

Trong ví dụ này, hiệu quả của việc sử dụng axit hữu cơ ở dạng kết hợp đối với hiệu quả tăng cường vị mặn của γ -Glu-Abu được đánh giá theo thử nghiệm đánh giá cảm quan định lượng.

Các thử nghiệm đánh giá cảm quan được thực hiện theo quy trình sau đây. “Whole Chicken Stock” có hàm lượng muối thấp bán tại Ajinomoto Co., Ltd. được hoà tan trong nước nóng sao cho dung dịch thu được có nồng độ muối thường là 0,48g/dL, sau đó lượng thích hợp của từng hợp chất thử nghiệm được hoà tan trong dung dịch và cường độ của vị mặn được xác định. Độ pH của dung dịch mẫu thu được sau khi hoà tan từng hợp chất thử nghiệm không khác với mẫu đối chứng không được bổ sung hợp chất thử nghiệm và do vậy, sự điều chỉnh độ pH là không cần thiết. Trong khi đánh giá cảm quan, không tính đến sự ảnh hưởng của, ví dụ, vị chua. Về điểm số của sự đánh giá cảm quan, để làm rõ hơn về tiêu chuẩn đánh giá, tiêu chuẩn đánh giá về vị mặn được đặt ra là như sau: mẫu đối chứng: 3 điểm; vị mặn được nhận thấy của súp được chế biến bằng cách gia tăng nồng độ muối lên 1,25 lần so với mẫu đối chứng: 4 điểm; và vị mặn cảm nhận được ở súp được chế biến bằng cách gia tăng nồng độ muối lên 1,5 lần so với mẫu đối chứng: 5 điểm, đồng thời thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng nhóm n người (số lượng người tham gia thử nghiệm) = 6. Các tính điểm hoặc đánh giá được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật đường chuẩn và cụ thể hơn, nó được thực hiện bằng cách ghi từng điểm số tương ứng lên đường thẳng trên đó các điểm số tương ứng với mốc 1 ~ 3 ~ 5 đã được ghi rõ. Người tham gia thử nghiệm được sử dụng trong thử nghiệm này là những người đã tham gia vào sự phát triển gia vị cho thực phẩm với thời gian không dưới 1 năm tích lũy kinh nghiệm và họ có thể nhận xét rằng mức chênh lệch về độ chuẩn giữa γ -Glu-Cys-Gly và γ -Glu-Val-Gly là khoảng 10 lần (đồng thời xác nhận khả năng của những người này ở các khoảng thời gian đã định). Các kết quả thu được như vậy được thể hiện ở Bảng 7 sau đây.

Bảng 7

Hợp chất		Nồng độ (g/dL)	Mức độ của vị mặn (điểm số)	Biên độ đánh giá cảm quan
γ -Glu-Abu		0,0040	3,56	Vị mặn dưới dạng vị ban đầu được gia tăng.
Sử dụng kết hợp 1	γ -Glu-Abu	0,0040	3,92	Cảm giác vị mặn dưới dạng vị ban đầu được gia tăng và độ đậm đà của súp được cải thiện.
	Axit lactic	0,0300		
Sử dụng kết hợp 2	γ -Glu-Abu	0,0040	3,76	Cảm nhận thấy vị mặn trong suốt thời gian từ giai đoạn vị ban đầu đến giai đoạn dư vị được gia tăng và độ đậm đà của súp được cải thiện.
	Axit malic	0,0300		

Như vậy, nhận thấy rằng axit lactic và axit malic là các axit hữu cơ khá thích hợp với γ -Glu-Abu và hiệu quả tăng cường vị mặn của γ -Glu-Abu tiếp tục được nâng cao bằng cách sử dụng axit lactic và axit malic, làm các axit hữu cơ, kết hợp với γ -Glu-Abu.

Nói cách khác, hiệu quả của γ -Glu-Abu là vị mặn được gia tăng một cách hài hoà có thể tiếp tục được cải thiện bằng cách sử dụng axit hữu cơ kết hợp với dipeptit. Do vậy, γ -Glu-Abu có thể được sản xuất từ các nguyên liệu hiện có được sử dụng rộng rãi với giá thành rẻ và là hợp chất có thể tiếp tục gia tăng hiệu quả truyền vị của các chất đã biết thông thường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân truyền vị kokumi chứa γ -Glu-Abu.
2. Tác nhân truyền vị kokumi phức hợp chứa hỗn hợp gồm
 - (a) γ -Glu-Abu; và
 - (b) một hoặc ít nhất hai axit amin hoặc các peptit được chọn từ nhóm bao gồm γ -Glu-X-Gly trong đó X là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin, γ -Glu-Val-Y trong đó Y là axit amin hoặc dẫn xuất axit amin, γ -Glu-Ala, γ -Glu-Gly, γ -Glu-Cys, γ -Glu-Met, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Val, γ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, D-Cys, γ -Glu-Met (O), γ -Glu- γ -Glu-Val, γ -Glu-Val-NH₂, γ -Glu-Val-ol, γ -Glu-Ser, γ -Glu-Tau, γ -Glu-Cys (S-Me) (O), γ -Glu-Leu, γ -Glu-Ile, γ -Glu-t-Leu và γ -Glu-Cys (S-Me).
3. Chế phẩm gia vị chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng.
4. Chế phẩm gia vị theo điểm 3, trong đó chế phẩm gia vị này chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 2500ppm khối lượng.
5. Phương pháp sản xuất thực phẩm bao gồm bước bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm, thành phần này chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, vào thành phần khác dùng cho thực phẩm.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chế biến tiếp hỗn hợp thu được gồm các thành phần dùng cho thực phẩm.
7. Phương pháp sản xuất đồ uống bao gồm bước bổ sung thành phần dùng cho đồ uống, thành phần này chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, vào thành phần khác dùng cho đồ uống.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chế biến tiếp hỗn hợp thu được gồm các thành phần dùng cho đồ uống, nếu cần.
9. Phương pháp sản xuất sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, thành phần này chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng, vào thành phần khác dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó bước bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống chứa γ -Glu-Abu vào thành phần khác dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống còn bao gồm bước điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống đến mức nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng.

11. Phương pháp sản xuất sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống mà chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng vào thành phần khác dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống để nhờ đó điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu đến mức nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng

12. Phương pháp sản xuất thực phẩm, bao gồm bước: bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm mà chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng vào thành phần khác dùng cho thực phẩm để theo cách đó thu được sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến thực phẩm trong đó nồng độ của γ -Glu-Abu nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng, và sau đó bổ sung sản phẩm trung gian thu được được sử dụng để chế biến thực phẩm vào thành phần khác dùng cho thực phẩm để bằng cách đó điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

13. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bước bổ sung thành phần dùng cho thực phẩm chứa γ -Glu-Abu vào thành phần khác dùng cho thực phẩm còn bao gồm công đoạn điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong thực phẩm đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5, 6, 12 và 13, trong đó thực phẩm là thực phẩm có hàm lượng muối thấp.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó còn bao gồm bước bổ sung ít nhất một axit hữu cơ hoặc muối của nó được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit citric, axit malic và axit succinic và các muối của chúng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng trong thực phẩm thu được, vào thành phần dùng cho thực phẩm.

16. Phương pháp sản xuất đồ uống, bao gồm bước: bổ sung thành phần dùng cho đồ uống mà chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 1000ppm khối lượng vào

thành phần khác dùng cho đồ uống để theo cách đó thu được sản phẩm trung gian được sử dụng để chế biến đồ uống trong đó nồng độ của γ -Glu-Abu nằm trong khoảng từ 400 đến 500.000ppm khối lượng, và sau đó bổ sung sản phẩm trung gian thu được được sử dụng để chế biến đồ uống vào thành phần khác dùng cho đồ uống để bằng cách đó điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

17. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước bổ sung thành phần dùng cho đồ uống chứa γ -Glu-Abu vào thành phần khác dùng cho thực phẩm còn bao gồm công đoạn điều chỉnh nồng độ của γ -Glu-Abu trong đồ uống đến mức nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng.

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7, 8, 16 và 17, trong đó đồ uống là đồ uống có hàm lượng muối thấp.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó còn bao gồm bước bổ sung ít nhất một axit hữu cơ hoặc muối của nó được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit xitric, axit malic và axit succinic và các muối của chúng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng trong đồ uống thu được, vào thành phần dùng cho đồ uống.

20. Thực phẩm mà có thể thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5, 6, 12 và 13.

21. Đồ uống mà có thể thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7, 8, 16 và 17.

22. Sản phẩm trung gian dùng để sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống có thể thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10 và 11.

23. Thực phẩm chứa γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng; ít nhất một axit hữu cơ hoặc muối của nó được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit xitric, axit malic và axit succinic với lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng; và muối thường với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng, cũng như chất mang dùng được trong thực phẩm, một hoặc ít nhất hai thành phần gia vị, hoặc cả chất mang lẫn các thành phần gia vị, tính theo tổng khối lượng của thực phẩm.

24. Đồ uống chứa γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng; ít nhất một axit hữu cơ hoặc muối của nó được chọn từ nhóm bao gồm axit lactic, axit xitric, axit malic và axit succinic với lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1% khối lượng; và muối thường với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng, cũng như chất mang dùng được cho đồ uống, một hoặc ít nhất hai thành phần gia vị, hoặc cả chất mang lẫn các thành phần gia vị, tính theo tổng khối lượng của đồ uống.

25. Phương pháp tăng cường vị của thực phẩm bao gồm bước kết hợp chế phẩm chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 400ppm khối lượng vào thực phẩm.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó sự tăng cường vị là sự truyền vị kokumi cho thực phẩm.

27. Phương pháp tăng cường vị của đồ uống bao gồm bước kết hợp chế phẩm chứa γ -Glu-Abu với lượng không thấp hơn 400ppm khối lượng vào đồ uống.

28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó sự tăng cường vị là sự truyền vị kokumi cho đồ uống.

29. Thực phẩm chứa γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng và muối thường với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng.

30. Đồ uống chứa γ -Glu-Abu với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 200ppm khối lượng và muối thường với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5% khối lượng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ajinomoto Co., Inc.
 <120> Tác nhân truyền vị kokumi và tác nhân truyền vị kokumi phức hợp
 <130> Y1R-0006
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 4924
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (373)..(3609)
 <223>
 <400> 1
 caacaggcac ctggctgcag ccaggaagga cgcacgccc ttctgcgcag gagagtggaa 60
 ggagggagct gtttgccagc accgaggtct tgcggcacag gcaacgcttg acctgagtct 120
 tgcagaatga aaggcatcac aggaggcctc tgcattgatgt ggcttccaaa gactcaagga 180
 ccaccacat tacaagtctg gattgaggaa ggcagaaatg gagattcaaa caccacgtct 240
 tctattatatt tattaatcaa tctgtagaca tgtgtcccca ctgcagggag tgaactgctc 300
 caagggagaa acttctggga gcctccaaac tcctagctgt ctcatccott gccctggaga 360
 gacggcagaa cc atg gca ttt tat agc tgc tgc tgg gtc ctc ttg gca ctc 411
 Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu
 1 5 10
 acc tgg cac acc tct gcc tac ggg cca gac cag cga gcc caa aag aag 459
 Thr Trp His Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys
 15 20 25
 ggg gac att atc ctt ggg ggg ctc ttt oct att cat ttt gga gta gca 507
 Gly Asp Ile Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala
 30 35 40 45
 gct aaa gat caa gat ctc aaa tca agg ccg gag tct gtg gaa tgt atc 555
 Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile
 50 55 60
 agg tat aat ttc cgt ggg ttt cgc tgg tta cag gct atg ata ttt gcc 603
 Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala
 65 70 75
 ata gag gag ata aac agc agc cca gcc ctt ctt ccc aac ttg acg ctg 651
 Ile Glu Glu Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu
 80 85 90
 gga tac agg ata ttt gac act tgc aac acc gtt tct aag gcc ttg gaa 699
 Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu
 95 100 105
 gcc acc ctg agt ttt gtt gct caa aac aaa att gat tct ttg aac ctt 747
 Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu
 110 115 120 125

gat	gag	ttc	tgc	aac	tgc	tca	gag	cac	att	ccc	tct	acg	att	gct	gtg	795
Asp	Glu	Phe	Cys	Asn	Cys	Ser	Glu	His	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Val	
				130					135					140		
gtg	gga	gca	act	ggc	tca	ggc	gtc	tcc	acg	gca	gtg	gca	aat	ctg	ctg	843
Val	Gly	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Asn	Leu	Leu	
			145					150					155			
ggg	ctc	ttc	tac	att	ccc	cag	gtc	agt	tat	gcc	tcc	tcc	agc	aga	ctc	891
Gly	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Gln	Val	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser	Arg	Leu	
		160					165					170				
ctc	agc	aac	aag	aat	caa	ttc	aag	tct	ttc	ctc	cga	acc	atc	ccc	aat	939
Leu	Ser	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Lys	Ser	Phe	Leu	Arg	Thr	Ile	Pro	Asn	
	175					180					185					
gat	gag	cac	cag	gcc	act	gcc	atg	gca	gac	atc	atc	gag	tat	ttc	cgc	987
Asp	Glu	His	Gln	Ala	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	
190					195					200					205	
tgg	aac	tgg	gtg	ggc	aca	att	gca	gct	gat	gac	gac	tat	ggg	cgg	ccg	1035
Trp	Asn	Trp	Val	Gly	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	Asp	Asp	Tyr	Gly	Arg	Pro	
				210					215					220		
ggg	att	gag	aaa	ttc	cga	gag	gaa	gct	gag	gaa	agg	gat	atc	tgc	atc	1083
Gly	Ile	Glu	Lys	Phe	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Arg	Asp	Ile	Cys	Ile	
			225					230					235			
gac	ttc	agt	gaa	ctc	atc	tcc	cag	tac	tct	gat	gag	gaa	gag	atc	cag	1131
Asp	Phe	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Gln	
		240					245					250				
cat	gtg	gta	gag	gtg	att	caa	aat	tcc	acg	gcc	aaa	gtc	atc	gtg	gtt	1179
His	Val	Val	Glu	Val	Ile	Gln	Asn	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Val	
	255					260					265					
ttc	tcc	agt	ggc	cca	gat	ctt	gag	ccc	ctc	atc	aag	gag	att	gtc	cgg	1227
Phe	Ser	Ser	Gly	Pro	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu	Ile	Lys	Glu	Ile	Val	Arg	
270					275					280					285	
cgc	aat	atc	acg	ggc	aag	atc	tgg	ctg	gcc	agc	gag	gcc	tgg	gcc	agc	1275
Arg	Asn	Ile	Thr	Gly	Lys	Ile	Trp	Leu	Ala	Ser	Glu	Ala	Trp	Ala	Ser	
				290					295					300		
tcc	tcc	ctg	atc	gcc	atg	cct	cag	tac	ttc	cac	gtg	gtt	ggc	ggc	acc	1323
Ser	Ser	Leu	Ile	Ala	Met	Pro	Gln	Tyr	Phe	His	Val	Val	Gly	Gly	Thr	
			305					310					315			
att	gga	ttc	gct	ctg	aag	gct	ggg	cag	atc	cca	ggc	ttc	cgg	gaa	ttc	1371
Ile	Gly	Phe	Ala	Leu	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Pro	Gly	Phe	Arg	Glu	Phe	
		320					325					330				
ctg	aag	aag	gtc	cat	ccc	agg	aag	tct	gtc	cac	aat	ggg	ttt	gcc	aag	1419
Leu	Lys	Lys	Val	His	Pro	Arg	Lys	Ser	Val	His	Asn	Gly	Phe	Ala	Lys	
	335					340					345					
gag	ttt	tgg	gaa	gaa	aca	ttt	aac	tgc	cac	ctc	caa	gaa	ggg	gca	aaa	1467
Glu	Phe	Trp	Glu	Glu	Thr	Phe	Asn	Cys	His	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Lys	
350					355					360					365	
gga	cct	tta	cct	gtg	gac	acc	ttt	ctg	aga	ggg	cac	gaa	gaa	agt	ggc	1515
Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Asp	Thr	Phe	Leu	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Ser	Gly	
				370					375					380		
gac	agg	ttt	agc	aac	agc	tcg	aca	gcc	ttc	cga	ccc	ctc	tgt	aca	ggg	1563
Asp	Arg	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Thr	Ala	Phe	Arg	Pro	Leu	Cys	Thr	Gly	
			385					390					395			

gat	gag	aac	atc	agc	agt	gtc	gag	acc	cct	tac	ata	gat	tac	acg	cat	1611
Asp	Glu	Asn	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Thr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Thr	His	
		400					405					410				
tta	cgg	ata	tcc	tac	aat	gtg	tac	tta	gca	gtc	tac	tcc	att	gcc	cac	1659
Leu	Arg	Ile	Ser	Tyr	Asn	Val	Tyr	Leu	Ala	Val	Tyr	Ser	Ile	Ala	His	
	415					420				425						
gcc	ttg	caa	gat	ata	tat	acc	tgc	tta	cct	ggg	aga	ggg	ctc	ttc	acc	1707
Ala	Leu	Gln	Asp	Ile	Tyr	Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Thr	
430					435					440					445	
aat	ggc	tcc	tgt	gca	gac	atc	aag	aaa	gtt	gag	gcg	tgg	cag	gtc	ctg	1755
Asn	Gly	Ser	Cys	Ala	Asp	Ile	Lys	Lys	Val	Glu	Ala	Trp	Gln	Val	Leu	
				450					455					460		
aag	cac	cta	cgg	cat	cta	aac	ttt	aca	aac	aat	atg	ggg	gag	cag	gtg	1803
Lys	His	Leu	Arg	His	Leu	Asn	Phe	Thr	Asn	Asn	Met	Gly	Glu	Gln	Val	
			465					470						475		
acc	ttt	gat	gag	tgt	ggc	gac	ctg	gtg	ggg	aac	tat	tcc	atc	atc	aac	1851
Thr	Phe	Asp	Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asn	
		480					485					490				
tgg	cac	ctc	tcc	cca	gag	gat	ggc	tcc	atc	gtg	ttt	aag	gaa	gtc	ggg	1899
Trp	His	Leu	Ser	Pro	Glu	Asp	Gly	Ser	Ile	Val	Phe	Lys	Glu	Val	Gly	
	495					500					505					
tat	tac	aac	gtc	tat	gcc	aag	aag	gga	gaa	aga	ctc	ttc	atc	aac	gag	1947
Tyr	Tyr	Asn	Val	Tyr	Ala	Lys	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Phe	Ile	Asn	Glu	
510					515					520					525	
gag	aaa	atc	ctg	tgg	agt	ggg	ttc	tcc	agg	gag	gtg	ccc	ttc	tcc	aac	1995
Glu	Lys	Ile	Leu	Trp	Ser	Gly	Phe	Ser	Arg	Glu	Val	Pro	Phe	Ser	Asn	
				530					535					540		
tgc	agc	cga	gac	tgc	ctg	gca	ggg	acc	agg	aaa	ggg	atc	att	gag	ggg	2043
Cys	Ser	Arg	Asp	Cys	Leu	Ala	Gly	Thr	Arg	Lys	Gly	Ile	Ile	Glu	Gly	
			545					550					555			
gag	ccc	acc	tgc	tgc	ttt	gag	tgt	gtg	gag	tgt	cct	gat	ggg	gag	tat	2091
Glu	Pro	Thr	Cys	Cys	Phe	Glu	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Asp	Gly	Glu	Tyr	
		560					565					570				
agt	gat	gag	aca	gat	gcc	agt	gcc	tgt	aac	aag	tgc	cca	gat	gac	ttc	2139
Ser	Asp	Glu	Thr	Asp	Ala	Ser	Ala	Cys	Asn	Lys	Cys	Pro	Asp	Asp	Phe	
	575					580					585					
tgg	tcc	aat	gag	aac	cac	acc	tcc	tgc	att	gcc	aag	gag	atc	gag	ttt	2187
Trp	Ser	Asn	Glu	Asn	His	Thr	Ser	Cys	Ile	Ala	Lys	Glu	Ile	Glu	Phe	
590					595					600					605	
ctg	tcg	tgg	acg	gag	ccc	ttt	ggg	atc	gca	ctc	acc	ctc	ttt	gcc	gtg	2235
Leu	Ser	Trp	Thr	Glu	Pro	Phe	Gly	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Ala	Val	
				610					615					620		
ctg	ggc	att	ttc	ctg	aca	gcc	ttt	gtg	ctg	ggc	gtg	ttt	atc	aag	ttc	2283
Leu	Gly	Ile	Phe	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	Val	Phe	Ile	Lys	Phe	
			625					630					635			
cgc	aac	aca	ccc	att	gtc	aag	gcc	acc	aac	cga	gag	ctc	tcc	tac	ctc	2331
Arg	Asn	Thr	Pro	Ile	Val	Lys	Ala	Thr	Asn	Arg	Glu	Leu	Ser	Tyr	Leu	
		640					645					650				
ctc	ctc	ttc	tcc	ctg	ctc	tgc	tgc	ttc	tcc	agc	tcc	ctg	ttc	ttc	atc	2379
Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Cys	Phe	Ser	Ser	Ser	Leu	Phe	Phe	Ile	

655	660	665	
ggg gag ccc cag gac tgg acg tgc cgc ctg cgc cag ccg gcc ttt ggc Gly Glu Pro Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly 670 675 680 685			2427
atc agc ttc gtg ctc tgc atc tca tgc atc ctg gtg aaa acc aac cgt Ile Ser Phe Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg 690 695 700			2475
gtc ctc ctg gtg ttt gag gcc aag atc ccc acc agc ttc cac cgc aag Val Leu Leu Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys 705 710 715			2523
tgg tgg ggg ctc aac ctg cag ttc ctg ctg gtt ttc ctc tgc acc ttc Trp Trp Gly Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe 720 725 730			2571
atg cag att gtc atc tgt gtg atc tgg ctc tac acc gcg ccc ccc tca Met Gln Ile Val Ile Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser 735 740 745			2619
agc tac cgc aac cag gag ctg gag gat gag atc atc ttc atc acg tgc Ser Tyr Arg Asn Gln Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys 750 755 760 765			2667
cac gag ggc tcc ctc atg gcc ctg ggc ttc ctg atc ggc tac acc tgc His Glu Gly Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys 770 775 780			2715
ctg ctg gct gcc atc tgc ttc ttc ttt gcc ttc aag tcc cgg aag ctg Leu Leu Ala Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu 785 790 795			2763
ccg gag aac ttc aat gaa gcc aag ttc atc acc ttc agc atg ctc atc Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile 800 805 810			2811
ttc ttc atc gtc tgg atc tcc ttc att cca gcc tat gcc agc acc tat Phe Phe Ile Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr 815 820 825			2859
ggc aag ttt gtc tct gcc gta gag gtg att gcc atc ctg gca gcc agc Gly Lys Phe Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser 830 835 840 845			2907
ttt ggc ttg ctg gcg tgc atc ttc ttc aac aag atc tac atc att ctc Phe Gly Leu Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu 850 855 860			2955
ttc aag cca tcc cgc aac acc atc gag gag gtg cgt tgc agc acc gca Phe Lys Pro Ser Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala 865 870 875			3003
gct cac gct ttc aag gtg gct gcc cgg gcc acg ctg cgc cgc agc aac Ala His Ala Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn 880 885 890			3051
gtc tcc cgc aag cgg tcc agc agc ctt gga ggc tcc acg gga tcc acc Val Ser Arg Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr 895 900 905			3099
ccc tcc tcc tcc atc agc agc aag agc aac agc gaa gac cca ttc cca Pro Ser Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro 910 915 920 925			3147
cag ccc gag agg cag aag cag cag cag ccg ctg gcc cta acc cag caa			3195

Gln Pro Glu Arg	Gln Lys Gln Gln Gln	Pro Leu Ala Leu Thr	Gln Gln	
	930	935	940	
gag cag cag cag	cag ccc ctg acc ctc	cca cag cag caa cga tct cag		3243
Glu Gln Gln Gln	Gln Gln Pro Leu Thr	Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln		
	945	950	955	
cag cag ccc aga tgc aag cag aag gtc atc ttt ggc agc ggc acg gtc				3291
Gln Gln Pro Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val				
	960	965	970	
acc ttc tca ctg agc ttt gat gag cct cag aag aac gcc atg gcc cac				3339
Thr Phe Ser Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His				
	975	980	985	
agg aat tct acg cac cag aac tcc ctg gag gcc cag aaa agc agc gat				3387
Arg Asn Ser Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp				
	990	995	1000	1005
acg ctg acc cga cac cag cca tta ctc ccg ctg cag tgc ggg gaa				3432
Thr Leu Thr Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu				
	1010	1015	1020	
acg gac tta gat ctg acc gtc cag gaa aca ggt ctg caa gga cct				3477
Thr Asp Leu Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro				
	1025	1030	1035	
gtg ggt gga gac cag cgg cca gag gtg gag gac cct gaa gag ttg				3522
Val Gly Gly Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu				
	1040	1045	1050	
tcc cca gca ctt gta gtg tcc agt tca cag agc ttt gtc atc agt				3567
Ser Pro Ala Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser				
	1055	1060	1065	
ggt gga ggc agc act gtt aca gaa aac gta gtg aat tca taa				3609
Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser				
	1070	1075		
aatggaagga gaagactggg ctagggagaa tgcagagagg tttcttgggg tcccagggaa				3669
gaggaatcgc cccagactcc tttcctctga ggaagaaggg ataatagaca catcaaatgc				3729
cccgaattta gtcacaccat cttaaatagac agtgaattga cccatgttcc ctttaaaatt				3789
aaaaaaaaga agagccttgt gtttctgtgg ttgcatttgt caaagcattg agatctccac				3849
ggtcagatatt gctgttcacc cacatctaata gtctcttctc ctgttctatc ccaccaaca				3909
gctcagagat gaaactatgg ctttaaaacta ccctccagag tgtgcagact gatgggacat				3969
caaatttgcc accactagag ctgagagtct gaaagacaga atgtcaccag tcttgcccaa				4029
tgccttgaca acagactgaa ttttaaatgt tcacaacata aggagaatgt atctcctcct				4089
atztatgaaa accatatgat attttgtctc ctacctgctg ctgctattat gtaacatcca				4149
gaaggtttgc acccctccta taccatatgt ctgcttctgt ccaggacatg atactgatgc				4209
catgtttaga ttccaggatc acaagaatca cctcaaattg ttaggaaggg actgcataaa				4269
ccaatgagct gtatctgtaa ttaatatattcc tatatgtagc tttatcctta ggaaaatgct				4329
tctgttgtaa tagtccatgg acaatataaaa ctgaaaaatg tcagtctggg ttatataagg				4389
cagtattatt gagctctatt tccccacccc actatcctca ctcccataag ctaagcctta				4449

```

tgtgagcccc ttcagggact caagggtcca gaagtcctc ccatctctac cccaaagaat 4509
tcctgaagcc agatccaccc tatccctgta cagagtaagt tctcaattat tggcctgcta 4569
atagctgcta gggtaggaaa gcgtggttcc aagaaagatc caccctcaaa tgtcagagct 4629
atgttcctc cagcagtggg attaatactg ccggtcaccc aggctctgga gccagagaga 4689
cagaccgggg ttcaagccat ggcttcgtca tttgcaagct gaggtagctgt aggcagggaa 4749
ccttaacctc tctaagccac agcttcttca tctttaaaat aaggataata atcattcttt 4809
cccctcagag ctcttatgtg gattaaacga gataatgtat ataaagtact ttagcctggg 4869
acctagcaca caataagcat tcaataaata ttagttaata ttattaaaaa aaaaa 4924

```

```

<210> 2
<211> 1078
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
1          5          10          15

```

```

Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
          20          25          30

```

```

Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
          35          40          45

```

```

Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
          50          55          60

```

```

Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
65          70          75          80

```

```

Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
          85          90          95

```

```

Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
          100          105          110

```

```

Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
          115          120          125

```

```

Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
          130          135          140

```

```

Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
145          150          155          160

```

```

Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn
          165          170          175

```

Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His
 180 185 190

Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp
 195 200 205

Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu
 210 215 220

Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser
 225 230 235 240

Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val
 245 250 255

Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser
 260 265 270

Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile
 275 280 285

Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu
 290 295 300

Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe
 305 310 315 320

Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys
 325 330 335

Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp
 340 345 350

Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu
 355 360 365

Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe
 370 375 380

Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn
 385 390 395 400

Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile
 405 410 415

Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln
 420 425 430

Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser
 435 440 445

Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu
 450 455 460

Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp
 465 470 475 480

Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu
 485 490 495

Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn
 500 505 510

Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile
 515 520 525

Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg
 530 535 540

Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr
 545 550 555 560

Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu
 565 570 575

Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn
 580 585 590

Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Phe Leu Ser Trp
 595 600 605

Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile
 610 615 620

Phe Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr
 625 630 635 640

Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe
 645 650 655

Ser Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro
 660 665 670

Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe
 675 680 685

Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu
 690 695 700

Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys Trp Trp Gly

20735

705		710		715		720
Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe Met Gln Ile	725		730		735	
Val Ile Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg	740		745		750	
Asn Gln Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys His Glu Gly	755		760		765	
Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala	770		775		780	
Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn	785		790		795	800
Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile	805		810		815	
Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe	820		825		830	
Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu	835		840		845	
Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro	850		855		860	
Ser Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala	865		870		875	880
Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg	885		890		895	
Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser	900		905		910	
Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu	915		920		925	
Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln	930		935		940	
Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro	945		950		955	960
Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser	965		970		975	

Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Arg Asn Ser
 980 985 990

Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr
 995 1000 1005

Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu
 1010 1015 1020

Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly
 1025 1030 1035

Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala
 1040 1045 1050

Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly
 1055 1060 1065

Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser
 1070 1075

<210> 3
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 3
 actaatacga ctcactatag ggaccatggc attttatagc tgctgctgg

49

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 4
 ttatgaattc actacgtttt ctgtaacag

29

Fig.1

