



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

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

(11)



1-0025182

(51)⁷ C12C 5/02; C12G 3/02

(13) B

(21) 1-2012-01350

(22) 21/10/2010

(86) PCT/JP2010/068637 21/10/2010

(87) WO2011/052483A1 05/05/2011

(30) 2009-246873 27/10/2009 JP; 2010-045324 02/03/2010 JP

(45) 25/08/2020 389

(43) 27/08/2012 293A

(73) SAPPORO BREWERIES LIMITED (JP)

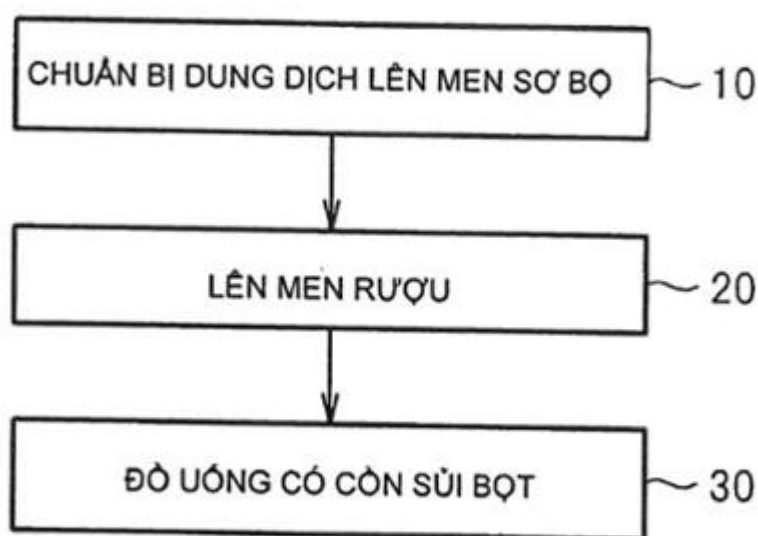
20-1, Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 1508522 Japan

(72) KIMURA, Tatsuji (JP); ARAKI, Shigeki (JP); TAKAZUMI, Koji (JP); IIMURE, Takashi (JP).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) ĐỒ UỐNG CÓ GA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến đồ uống có ga với các đặc tính bọt được cải thiện một cách hiệu quả và phương pháp sản xuất đồ uống này. Đồ uống có ga với các đặc tính bọt được cải thiện nhờ việc làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước hoặc chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Khi đồ uống có ga là đồ uống có cồn có ga, phương pháp sản xuất đồ uống có cồn có ga bao gồm: bước lên men sơ bộ (10) là điều chế dung dịch lên men sơ bộ sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch; và bước lên men (20) là tiến hành lên men rượu bằng cách bổ sung nấm men vào dung dịch lên men sơ bộ, trong đó các đặc tính bọt của đồ uống có cồn có ga được cải thiện bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến đồ uống có ga và phương pháp sản xuất đồ uống này. Cụ thể hơn, sáng chế là đề cập đến việc cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có ga.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thông thường, ví dụ, Tài liệu Patent 1 mô tả chất cải thiện đặc tính tạo bọt và tính ổn định bọt, như saponin được chiết xuất từ thực vật, được sử dụng để cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có cồn có ga.

Trong khi đó, Tài liệu Patent 2 mô tả rằng proteaza có hoạt tính nhất định được sử dụng trong sản xuất đồ uống có cồn có ga. Tuy nhiên, về vấn đề này, thường thừa nhận rằng việc sử dụng proteaza làm giảm tính ổn định bọt của đồ uống có cồn có ga, như được mô tả trong Tài liệu Patent 2.

Tài liệu tình trạng kỹ thuật

Tài liệu Patent

Tài liệu Patent 1: WO 2004/000990 A1

Tài liệu Patent 2: JP 2008-109861 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề mà sáng chế giải quyết

Theo công nghệ được mô tả trong Tài liệu Patent 1 nêu trên, mặc dù các đặc tính bọt của đồ uống có cồn có ga có thể được cải thiện, nhưng vẫn cần thiết sử dụng chất cải thiện đặc tính tạo bọt và tính ổn định bọt chuyên dụng cho mục đích cải thiện các đặc tính bọt.

Theo công nghệ được mô tả trong Tài liệu Patent 2 nêu trên, có mô tả rằng sự phân hủy protein tạo bọt do việc sử dụng proteaza được ngăn chặn, nhưng không có mô tả nào về việc cải thiện tính ổn định bọt.

Sáng chế được tạo ra để giải quyết vấn đề này, và một mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống có ga với các đặc tính bọt được cải thiện một cách hiệu quả và phương pháp sản xuất đồ uống này.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Theo một phương án của sáng chế để giải quyết vấn đề nêu trên, đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc nhiều hơn. Sáng chế đề xuất đồ uống có ga có các đặc tính bột được cải thiện một cách hiệu quả.

Hơn nữa, polypeptit kỵ nước này có thể có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn. Hơn nữa, polypeptit kỵ nước này có thể có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn.

Hơn nữa, polypeptit kỵ nước này có thể bao gồm polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa. Hơn nữa, polypeptit kỵ nước này có thể là polypeptit thu được từ lúa mạch.

Theo một phương án của sáng chế để giải quyết vấn đề này, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch. Phương pháp này bao gồm việc xử lý lúa mạch bằng proteaza để tạo ra đồ uống có ga có hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng so với trường hợp không xử lý lúa mạch bằng proteaza. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất đồ uống có ga có các đặc tính bột được cải thiện một cách hiệu quả.

Hơn nữa, nguyên liệu thô có thể còn bao gồm thêm lúa mạch nảy mầm, và việc xử lý lúa mạch bằng proteaza có thể được thực hiện mà không có bước trộn lúa mạch với lúa mạch nảy mầm. Hơn nữa, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza có thể được thực hiện để sản xuất đồ uống có ga có hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn so với trường hợp không xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Theo một phương án của sáng chế để giải quyết vấn đề này, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, phương pháp này bao gồm: bước xử lý lúa mạch là giữ chế phẩm lúa mạch chứa lúa mạch và proteaza ở nhiệt độ mà proteaza hoạt động trong bể thứ nhất; bước xử lý lúa mạch nảy mầm là giữ chế phẩm lúa mạch nảy mầm chứa lúa mạch nảy mầm ở nhiệt độ mà enzym có trong lúa mạch nảy mầm hoạt động trong bể thứ hai, bước này song song với bước xử lý lúa mạch; và bước trộn để trộn chế phẩm lúa mạch được xử lý bằng proteaza trong bước xử lý lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm được xử lý bằng enzym trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất đồ uống có ga với các đặc tính bột được cải thiện một cách hiệu quả.

Theo một phương án của sáng chế để giải quyết vấn đề này, tác nhân cải thiện các đặc tính bọt bao gồm polypeptit kỵ nước làm thành phần hoạt tính. Sáng chế đề xuất tác nhân cải thiện các đặc tính bọt, có khả năng cải thiện một cách hiệu quả các đặc tính bọt của đồ uống có ga.

Theo một phương án của sáng chế để giải quyết vấn đề này, phương pháp sản xuất đồ uống có ga bao gồm việc sử dụng tác nhân cải thiện các đặc tính bọt. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất đồ uống có ga với các đặc tính bọt được cải thiện một cách hiệu quả.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất đồ uống có ga với các đặc tính bọt được cải thiện một cách hiệu quả và phương pháp sản xuất đồ uống này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa các bước chính có trong một ví dụ về phương pháp sản xuất đồ uống có cồn có ga theo một phương án của sáng chế.

FIG.2A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.2B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P1 bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.2C là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.2D là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được

xử lý bằng proteaza P7 bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.3 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa sự tương quan giữa hàm lượng polypeptit kỵ nước và giá trị NIBEM, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.4 là hình vẽ thể hiện bảng minh họa mối liên hệ giữa loại proteaza và mỗi hàm lượng polypeptit kỵ nước và giá trị NIBEM, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.5 là hình vẽ thể hiện bảng minh họa kết quả phân tích chế phẩm axit amin của polypeptit kỵ nước trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.6A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng sắc ký lọc gel trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.6B là hình vẽ thể hiện biểu đồ phóng to một phần minh họa phổ sắc ký được minh họa trên FIG.6A.

FIG.7A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ khác về phổ sắc ký thu được bằng sắc ký lọc gel trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.7B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ khác nữa về phổ sắc ký thu được bằng sắc ký lọc gel trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.8A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ nhất của dung dịch lên men sơ bộ, được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza, bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.8B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ nhất của dung dịch lên men sơ bộ, được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5, bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.9A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ hai của dung dịch lên men sơ bộ, được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza, bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.9B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ hai của dung dịch lên men sơ bộ, được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5, bằng sắc ký pha đảo trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.10A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích kết tủa của chiết xuất lúa mạch trong amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% bằng sắc ký lọc gel trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.10B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích kết tủa của phần chiết lúa mạch trong amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75% bằng sắc ký lọc gel trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.11 là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được bằng sắc ký trao đổi cation trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.12 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa mối liên hệ giữa lượng proteaza được bổ sung và mỗi giá trị NIBEM và độ bám dính bột, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.13 là hình vẽ thể hiện bảng minh họa mối liên hệ giữa lượng proteaza được bổ sung và mỗi hàm lượng polypeptit kỵ nước và giá trị NIBEM, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.14 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa mối liên hệ giữa lượng proteaza được bổ sung và kết quả đánh giá cảm quan, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.15 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa mối liên hệ giữa lượng lúa mạch được sử dụng và mỗi giá trị NIBEM và độ bám dính bột, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.16 là hình vẽ thể hiện bảng minh họa các hằng số Rekker được biến đổi đối với các axit amin.

FIG.17 là hình vẽ thể hiện bảng minh họa kết quả đánh giá sự tương quan giữa tổng các hằng số Rekker được biến đổi và thời gian lưu trong sắc ký pha đảo đối với nhiều peptit trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.18 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa mối liên hệ tuyến tính giữa tổng các hằng số Rekker được biến đổi và thời gian lưu trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao, thu được trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.19A là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa ví dụ về biểu đồ xử lý enzym trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.19B là hình vẽ thể hiện biểu đồ minh họa một ví dụ khác về biểu đồ xử lý enzym trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.20 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa ví dụ về kết quả đánh giá cảm quan trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.21 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa ví dụ về kết quả đánh giá các giá trị NIBEM trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

FIG.22 là hình vẽ thể hiện đồ thị minh họa một ví dụ khác về kết quả đánh giá cảm quan trong một ví dụ theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây là phần mô tả một phương án của sáng chế. Nên lưu ý rằng, sáng chế không chỉ giới hạn ở phương án này.

Trước tiên là phần mô tả đồ uống có ga theo phương án này (sau đây được gọi là "đồ uống theo sáng chế"). Theo phương án này, đồ uống có ga là đồ uống chứa khí cacbon dioxit và có, ví dụ, đặc tính tạo bọt nhờ đó lớp bọt được tạo ra ở phần chất lỏng bên trên khi được rót vào bình như cốc thủy tinh và tính ổn định bọt nhờ đó giữ được bọt được tạo ra trong khoảng thời gian định trước hoặc lâu hơn. Đặc biệt là, đồ uống có ga có giá trị NIBEM là 50 giây hoặc lâu hơn, được xác định theo phương pháp của Hiệp hội Bia châu Âu (European Brewery Convention - EBC).

Đồ uống có ga có thể là, ví dụ, đồ uống có cồn có ga. Theo phương án này, đồ uống có cồn có ga là đồ uống có ga với các đặc tính bọt nêu trên và chứa, ví dụ, etanol ở nồng độ 1% theo thể tích hoặc nhiều hơn. Các ví dụ cụ thể về đồ uống có cồn có ga bao gồm bia, bia có hàm lượng lúa mạch nảy mầm thấp, và đồ uống có cồn có ga thu được bằng cách bổ sung rượu mạnh vào bia có hàm lượng lúa mạch nảy mầm thấp (rượu mùi được định nghĩa trong Luật Thuế đối với đồ uống có cồn ở Nhật Bản).

Hơn nữa, đồ uống có ga cũng có thể là, ví dụ, đồ uống có ga không có cồn. Theo phương án này, đồ uống có ga không có cồn là đồ uống có ga với các đặc tính bột như được mô tả nêu trên và chứa, ví dụ, etanol ở nồng độ thấp hơn 1% theo thể tích.

Nên lưu ý rằng, giá trị NIBEM được sử dụng làm số chỉ thị về tính ổn định bột của đồ uống có cồn có ga như bia. Giá trị NIBEM được đánh giá dưới dạng thời gian (giây) cần để làm giảm độ cao của bột được tạo ra khi rót đồ uống có ga vào bình định trước, với lượng định trước. Do đó, khi giá trị NIBEM trở nên cao hơn, tính ổn định bột của đồ uống có ga cũng cao hơn (tính ổn định bột tuyệt vời).

Phương án này chủ yếu mô tả các ví dụ về việc tạo đồ uống theo sáng chế, là đồ uống có cồn có ga.

Đồ uống theo sáng chế là đồ uống có ga có các đặc tính bột được cải thiện nhờ việc làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước. Polypeptit kỵ nước là polypeptit cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga mới được phát hiện ra, là kết quả nghiên cứu sâu rộng của các tác giả sáng chế.

Cụ thể, protein Z có trọng lượng phân tử khoảng 40kDa (sau đây được gọi là "protein 40kDa") và protein chuyển lipid 1 (lipid transfer protein 1- LTP1) thường được biết đến là các protein cải thiện các đặc tính bột của bia. Mặt khác, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng một cách độc lập, và kết quả là đã tìm ra được polypeptit kỵ nước theo sáng chế là polypeptit mới, cải thiện các đặc tính bột, và khác với protein 40kDa và LTP1.

Polypeptit kỵ nước này được thu được, ví dụ, từ lúa mạch. Cụ thể, polypeptit kỵ nước có thể là polypeptit thu được bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Cụ thể hơn, polypeptit kỵ nước này là, ví dụ, polypeptit có sản lượng tăng bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza, so với trường hợp lúa mạch không được xử lý bằng proteaza.

Polypeptit kỵ nước được phát hiện trong khoảng thời gian lưu thể hiện tính kỵ nước có tương tác tương đối rộng với pha tĩnh trong sắc ký pha đảo sử dụng cột bao gồm pha tĩnh có tính phân cực thấp và pha động có tính phân cực cao.

Tính kỵ nước của polypeptit kỵ nước cũng có thể được đặc trưng bởi, ví dụ, tổng các hằng số Rekker được biến đổi (Tham khảo 1: R. F. Rekker, The Hydrophobic

Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977, p. 301, Tài liệu tham khảo 2: Tatsuru Sasagawa et al., Prediction of Peptide Retention Times in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography during Linear Gradient elution, Journal of Chromatography 240 (1982), 329-340, Tham khảo 3: Toshiaki Isobe, Norio Okuyama, Biophysical Chemistry Vol. 30, No. 1 (1986)).

Tổng các hằng số Rekker được biến đổi của polypeptit kỵ nước được biểu thị bởi " ΣD_{jnij} ". Trong đó, " D_j " là hằng số Rekker được biến đổi của từng axit amin để tạo nên polypeptit kỵ nước. Hơn nữa, " n_{ij} " là số của các gốc axit amin để tạo nên polypeptit kỵ nước. Polypeptit kỵ nước cũng có thể là polypeptit có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn. Polypeptit kỵ nước cũng có thể là polypeptit có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 19,7 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của tổng các hằng số Rekker được biến đổi là polypeptit kỵ nước không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là polypeptit kỵ nước này có thể được hòa tan trong đồ uống theo sáng chế, và có thể là 400, chẳng hạn.

Polypeptit kỵ nước cũng có thể là polypeptit có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn. Cụ thể, trong trường hợp này, polypeptit kỵ nước có thể là polypeptit có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn và có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn. Hơn nữa, tốt hơn là hàm lượng prolin của polypeptit kỵ nước là 14,5% mol hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 17,0% mol hoặc nhiều hơn. Hàm lượng prolin của polypeptit kỵ nước cũng có thể là 40,0% mol hoặc nhỏ hơn, chẳng hạn.

Polypeptit kỵ nước có thể bao gồm polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa. Cụ thể, trong trường hợp này, đồ uống theo sáng chế chứa polypeptit kỵ nước có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa.

Trọng lượng phân tử của polypeptit kỵ nước được đo, ví dụ, bằng sắc ký lọc gel. Cụ thể, polypeptit kỵ nước có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa là, ví dụ, polypeptit được phát hiện ở thời gian lưu tương ứng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa trong sắc ký lọc gel có sử dụng cột bao gồm pha tĩnh xốp hoạt động như rây phân tử.

Polypeptit kỵ nước cũng có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 15kDa. Cụ thể hơn, polypeptit kỵ nước có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có trọng lượng phân tử bằng khoảng 10kDa.

Polypeptit kỵ nước cũng có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kDa đến 25kDa. Cụ thể hơn, polypeptit kỵ nước có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có trọng lượng phân tử lớn hơn 15kDa và 25kDa hoặc nhỏ hơn, cụ thể, polypeptit có trọng lượng phân tử khoảng 20kDa.

Polypeptit kỵ nước cũng có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 15kDa (ví dụ, khoảng 10kDa) và polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kDa đến 25kDa (ví dụ, khoảng 20kDa).

Cụ thể, trong các trường hợp đó, đồ uống theo sáng chế có thể chứa một hoặc cả hai polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 15kDa (ví dụ, khoảng 10kDa) và polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kDa đến 25kDa (ví dụ, khoảng 20kDa). Polypeptit kỵ nước cũng có thể bao gồm, ví dụ, polypeptit có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,4.

Polypeptit kỵ nước là polypeptit có khả năng làm tăng giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga. Cụ thể, polypeptit kỵ nước có thể là, ví dụ, polypeptit làm tăng giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga thêm 10 giây hoặc lâu hơn thông qua việc tăng hàm lượng của nó trong đồ uống có cồn có ga thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống theo sáng chế, chỉ cần là các đặc tính bột mong muốn. Cụ thể, đồ uống theo sáng chế có thể chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Hơn nữa, hàm lượng polypeptit kỵ nước có thể là 1,2g/lít hoặc lớn hơn, hoặc cũng có thể là 1,3g/lít hoặc lớn hơn.

Cụ thể hơn, đồ uống theo sáng chế có thể là, ví dụ, đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Đồ uống theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Đồ uống theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn và có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Trong các trường hợp, hàm lượng prolin của polypeptit kỵ nước có thể tốt hơn là 14,5% mol hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 17,0% mol hoặc nhiều hơn, như được mô tả ở trên.

Các đặc tính bột của đồ uống theo sáng chế được cải thiện nhờ việc tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước. Các ví dụ về các đặc tính bột bao gồm đặc tính tạo bọt, tính ổn định bọt, và độ bám dính bột. Do đó, ví dụ, tính ổn định bọt của đồ uống theo sáng chế được cải thiện do hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng. Cụ thể, trong trường hợp này, giá trị NIBEM của đồ uống theo sáng chế tăng.

Đồ uống theo sáng chế có thể là, ví dụ, đồ uống có cồn có ga có giá trị NIBEM bằng hoặc cao hơn so với giá trị cho trước. Cụ thể, ví dụ, giá trị NIBEM của đồ uống theo sáng chế có thể là 300 giây hoặc lâu hơn, có thể là 320 giây hoặc lâu hơn, hoặc có thể là 350 giây hoặc lâu hơn.

Tiếp theo là phần mô tả phương pháp theo phương án này (sau đây được gọi là "phương pháp theo sáng chế"). Phương pháp theo sáng chế có thể là phương pháp sản xuất đồ uống có ga. Trong trường hợp này, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế. Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là phương pháp cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga.

Phương pháp theo sáng chế có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga với các đặc tính bột được cải thiện bằng cách làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước. Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga bằng cách làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với phương pháp làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước. Ví dụ, có thể dùng phương pháp xử lý lúa mạch có trong nguyên liệu thô bằng proteaza trong quá trình sản xuất đồ uống có ga, hoặc phương pháp bổ sung polypeptit kỵ nước thu được từ trước.

Phương pháp theo sáng chế có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc xử lý lúa mạch bằng proteaza để sản xuất đồ uống có ga có hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng. Cụ thể, trong trường hợp này, trong phương pháp theo sáng chế, hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga tăng, bằng cách xử lý lúa mạch trong nguyên liệu thô với proteaza, so với trường hợp trong đó lúa mạch không được xử lý bằng proteaza. Như được mô tả nêu trên, khi lúa mạch được sử dụng làm nguyên liệu thô, các đặc tính bột của đồ uống có ga được sản xuất có thể được cải thiện một cách hiệu quả bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza trong bước xử lý nguyên liệu thô.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có ga mà được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc xử lý lúa mạch bằng proteaza để cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có ga.

Cụ thể hơn, trong phương pháp theo sáng chế, ví dụ, đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn có thể được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza để tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước. Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có ga bằng cách xử lý lúa mạch có trong nguyên liệu thô với proteaza để làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga đến hàm lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Hơn nữa, hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga có thể tốt hơn là 1,2g/lít hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1,3g/lít hoặc lớn hơn.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, phương pháp này bao gồm việc xử lý lúa mạch bằng proteaza không có bước trộn lúa mạch với lúa mạch nảy mầm để sản xuất đồ uống có ga có hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng.

Cụ thể, trong trường hợp này, chế phẩm lúa mạch chứa polypeptit kỵ nước được tạo ra bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza, và sau đó trộn chế phẩm lúa mạch với lúa mạch nảy mầm. Do đó, có thể tránh được một cách hiệu quả ảnh hưởng của proteaza lên lúa mạch nảy mầm, cùng với việc tạo ra một cách hiệu quả polypeptit kỵ nước, bằng cách xử lý có chọn lọc, bằng proteaza, chỉ lúa mạch trong số lúa mạch và lúa mạch nảy mầm có trong nguyên liệu thô.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga có hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Cụ thể, trong trường hợp này, trong phương pháp theo sáng chế, hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch có trong nguyên liệu thô bằng proteaza, so với trường hợp mà lúa mạch không được xử lý bằng proteaza.

Việc xử lý lúa mạch bằng proteaza được thực hiện bằng cách trộn lúa mạch và proteaza với nước và giữ hỗn hợp được tạo ra ở nhiệt độ mà proteaza phản ứng. Không

có giới hạn cụ thể nào đối với nhiệt độ xử lý, chỉ cần là proteaza hoạt động, và có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 30°C đến 70°C, có thể tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30°C đến 65°C. Không có giới hạn cụ thể nào đối với thời gian giữ hỗn hợp ở nhiệt độ xử lý, chỉ cần là lúa mạch được xử lý đủ thời gian bằng proteaza, và có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 120 phút.

Khi nguyên liệu thô chứa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, ví dụ, việc xử lý bằng proteaza có thể được thực hiện bằng cách giữ hỗn hợp chứa lúa mạch, lúa mạch nảy mầm, proteaza, và nước ở nhiệt độ mà proteaza phản ứng.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, phương pháp này bao gồm: bước xử lý lúa mạch là giữ chế phẩm lúa mạch chứa lúa mạch và proteaza ở nhiệt độ mà proteaza hoạt động trong bể thứ nhất; bước xử lý lúa mạch nảy mầm là giữ chế phẩm lúa mạch nảy mầm chứa lúa mạch nảy mầm ở nhiệt độ mà enzym có trong lúa mạch nảy mầm hoạt động trong bể thứ hai, song song với bước xử lý lúa mạch; và bước trộn để trộn chế phẩm xử lý lúa mạch bằng proteaza trong bước xử lý lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm được xử lý bằng enzym trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm.

Trong trường hợp này, bước xử lý lúa mạch và bước xử lý lúa mạch nảy mầm được tiến hành song song. Cụ thể, ít nhất một phần của bước xử lý lúa mạch nảy mầm được tiến hành đồng thời với việc tiến hành ít nhất một phần của bước xử lý lúa mạch. Bể thứ nhất và bể thứ hai là không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là việc xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym có thể được thực hiện độc lập. Ví dụ, khi sử dụng thiết bị sản xuất đồ uống có cồn có ga như bia hoặc bia có hàm lượng lúa mạch nảy mầm thấp, thùng kín có thể được sử dụng làm bể thứ nhất và nồi kín có thể được sử dụng làm bể thứ hai.

Lúa mạch có thể được xử lý bằng proteaza ở nhiệt độ thứ nhất, và lúa mạch nảy mầm có thể được xử lý bằng enzym ở nhiệt độ thứ hai khác với nhiệt độ thứ nhất. Cụ thể, ví dụ, chế phẩm lúa mạch được giữ trong bể thứ nhất ở nhiệt độ thứ nhất trong bước xử lý lúa mạch, và chế phẩm lúa mạch nảy mầm được giữ trong bể thứ hai ở

hiệt độ thứ hai, nhiệt độ này thấp hơn so với nhiệt độ thứ nhất, trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm.

Trong trường hợp này, không có giới hạn cụ thể đối với nhiệt độ giữ chế phẩm lúa mạch, chỉ cần là ở nhiệt độ đó proteaza hoạt động, và có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 60°C đến 70°C, có thể tốt hơn là nằm trong khoảng từ 60°C đến 65°C. Hơn nữa, không có giới hạn cụ thể đối với nhiệt độ giữ chế phẩm lúa mạch nảy mầm, chỉ cần là ở nhiệt độ đó enzym có trong lúa mạch nảy mầm hoạt động, và có thể là, ví dụ, 45°C hoặc cao hơn và thấp hơn 60°C, có thể tốt hơn là 45°C hoặc cao hơn và thấp hơn 55°C. Nên lưu ý rằng, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm với enzym có thể được thực hiện ở cùng nhiệt độ.

Nên lưu ý rằng, trong bước xử lý lúa mạch, lúa mạch có thể được xử lý bằng proteaza mà không được trộn với lúa mạch nảy mầm, nhưng bước này không chỉ giới hạn ở đó, và ví dụ, chế phẩm lúa mạch có thể chứa lúa mạch nảy mầm với lượng nhỏ hơn so với lượng lúa mạch. Tương tự, trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm, lúa mạch nảy mầm có thể được xử lý bằng enzym và không được trộn với lúa mạch, nhưng bước này không chỉ giới hạn ở đó, và ví dụ, chế phẩm lúa mạch nảy mầm có thể chứa lúa mạch với lượng nhỏ hơn so với lượng lúa mạch nảy mầm.

Ở bước trộn, chế phẩm lúa mạch được đưa vào xử lý bằng proteaza được trộn với chế phẩm lúa mạch nảy mầm được đưa vào xử lý bằng enzym có trong lúa mạch nảy mầm. Không có giới hạn cụ thể nào đối với phương pháp trộn chế phẩm lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm.

Cụ thể, ví dụ, chế phẩm lúa mạch có thể được trộn với chế phẩm lúa mạch nảy mầm bằng cách chuyển một trong số chế phẩm lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm từ một trong số bể thứ nhất và bể thứ hai vào bể còn lại. Theo cách khác, chế phẩm lúa mạch có thể được trộn với chế phẩm lúa mạch nảy mầm trong bể thứ ba bằng cách chuyển lần lượt chế phẩm lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm từ bể thứ nhất và bể thứ hai vào bể thứ ba.

Như được mô tả ở trên, khi việc xử lý lúa mạch và việc xử lý lúa mạch nảy mầm được tiến hành một cách độc lập lần lượt trong bể thứ nhất và bể thứ hai, lúa mạch được xử lý đủ bằng proteaza để tạo ra polypeptit kỵ nước một cách hiệu quả, và

lúa mạch nảy mầm được xử lý một cách thích hợp bằng enzyme trong khi chắc chắn tránh được ảnh hưởng của proteaza đối với lúa mạch nảy mầm.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga mà được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza để tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn so với trường hợp mà lúa mạch không được xử lý bằng proteaza.

Trong trường hợp này, trong phương pháp theo sáng chế, ví dụ, hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga có thể tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn, và giá trị NIBEM của đồ uống có ga có thể cũng tăng thêm 10 giây hoặc nhiều hơn.

Hơn nữa, tốt hơn là hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga có thể tăng thêm 0,1g/lít hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là tăng thêm 0,15g/lít hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là tăng thêm 0,2g/lít hoặc nhiều hơn.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch thêm 0,3g hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Cụ thể, trong trường hợp này, trong phương pháp theo sáng chế, sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch tăng thêm 0,3g hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch có trong nguyên liệu thô bằng proteaza so với trường hợp mà lúa mạch không được xử lý bằng proteaza.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga mà được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza để làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch thêm 0,3g hoặc nhiều hơn.

Hơn nữa, tốt hơn là sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch có thể tăng thêm 0,6g/lít hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là tăng thêm 0,9g/lít hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là tăng thêm 1,2g/lít hoặc nhiều hơn.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc tạo ra polypeptit kỵ nước với lượng 6,6g hoặc nhiều hơn trên mỗi kg lúa mạch bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Khi phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất đồ uống có cồn có ga, thì dung dịch lên men sơ bộ chứa polypeptit kỵ nước thu được với lượng 6,6g hoặc nhiều hơn trên mỗi kg lúa mạch được điều chế, và tiến hành lên men rượu bằng cách bổ sung men vào dung dịch lên men sơ bộ.

Phương pháp theo sáng chế có thể là, ví dụ, phương pháp cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga mà được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, phương pháp này bao gồm việc cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có ga bằng cách làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch đến 6,6g hoặc lớn hơn bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Hơn nữa, tốt hơn là sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch là 7,0g hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 7,1g hoặc nhiều hơn, tốt nhất là 7,2g hoặc nhiều hơn.

FIG.1 là biểu đồ tiến trình minh họa các bước chính có trong một ví dụ về phương pháp sản xuất đồ uống có cồn có ga theo sáng chế. Như được minh họa trên FIG.1, phương pháp theo sáng chế trong ví dụ này bao gồm bước lên men sơ bộ 10 là bước điều chế dung dịch lên men sơ bộ sử dụng nguyên liệu thô chứa lúa mạch, bước lên men 20 là bước tiến hành lên men rượu bằng cách bổ sung men vào dung dịch lên men sơ bộ, và bước sau lên men 30 là bước thu nhận cuối cùng đồ uống có cồn có ga.

Trong bước lên men sơ bộ 10, đầu tiên, nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ được điều chế. Nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ chứa nguyên liệu thô lúa mạch. Nguyên liệu thô lúa mạch chứa ít nhất là lúa mạch (lúa mạch không nảy mầm). Không có giới hạn cụ thể nào đối với các loại lúa mạch và một hoặc nhiều loại lúa mạch bất kỳ có thể được sử dụng. Lúa mạch không có vỏ cũng có thể được sử dụng.

Nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa thêm lúa mạch nảy mầm. Cụ thể, trong trường hợp này, nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ chứa nguyên liệu thô lúa mạch chứa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm. Không có giới hạn cụ thể nào đối với các loại lúa mạch nảy mầm và một hoặc nhiều

loại bất kỳ có thể được sử dụng. Cụ thể, lúa mạch nảy mầm thường được sử dụng trong sản xuất đồ uống có cồn có ga như bia có thể được sử dụng làm lúa mạch nảy mầm. Lúa mạch nảy mầm có thể được sản xuất cho lúa mạch ngâm nước với lượng thích hợp để làm nảy mầm lúa mạch ở nhiệt độ thích hợp khi có mặt oxy.

Ví dụ, nguyên liệu thô lúa mạch có thể chứa lúa mạch với lượng 1% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn và lúa mạch nảy mầm với lượng 0% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 99% trọng lượng hoặc ít hơn, có thể chứa lúa mạch với lượng 32% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn và lúa mạch nảy mầm với lượng 0% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 68% trọng lượng hoặc ít hơn, có thể chứa lúa mạch với lượng 51% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn và lúa mạch nảy mầm với lượng 0% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 49% trọng lượng hoặc ít hơn, hoặc có thể chứa lúa mạch với lượng 76% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn và lúa mạch nảy mầm với lượng 0% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 24% trọng lượng hoặc ít hơn.

Tỷ lệ phần trăm của nguyên liệu thô lúa mạch trong nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ có thể là, ví dụ, 1% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn, 20% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 100% trọng lượng hoặc ít hơn, hoặc 25% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 95% trọng lượng hoặc ít hơn.

Nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa thêm hoa hublông. Không có giới hạn cụ thể nào đối với các loại hoa hublông và có thể sử dụng một hoặc nhiều loại bất kỳ của nó. Ngoài nguyên liệu thô lúa mạch nêu trên, nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa gạo, lúa mạch không vỏ, lúa mỳ, và lúa mỳ nảy mầm.

Nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa nguồn nitơ và nguồn cacbon có khả năng được đồng hóa bởi nấm men. Ví dụ, các protein thoái biến và peptit được tạo ra từ ngũ cốc, tinh bột thoái biến được tạo ra từ ngũ cốc, và cao nấm men có thể được sử dụng làm nguồn nitơ và nguồn cacbon. Đặc biệt là, ví dụ, các protein thoái biến và peptit có nguồn gốc từ đậu Hà Lan, đậu tương, hoặc ngô, sacarit lỏng (được gọi là đường lỏng) được sản xuất bằng cách phân hủy và tinh chế tinh bột có nguồn gốc từ ngũ cốc như ngô, và các protein, peptit, và các axit amin được chiết xuất từ nấm men có thể được sử dụng.

Ngoài ra, trong phương pháp theo sáng chế, lúa mạch có trong nguyên liệu thô để tạo dung dịch lên men sơ bộ được xử lý bằng proteaza. Cụ thể, ví dụ, xử lý lúa mạch bằng proteaza sao cho hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga mà được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế bằng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Trong trường hợp này, lúa mạch cũng có thể được xử lý bằng proteaza sao cho hàm lượng polypeptit kỵ nước bằng 1,2g/lít hoặc lớn hơn, hoặc 1,3g/lít hoặc lớn hơn.

Lúa mạch còn được xử lý bằng proteaza sao cho hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn. Trong trường hợp này, lúa mạch cũng có thể được xử lý bằng proteaza sao cho hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng thêm 0,1g/lít hoặc nhiều hơn, 0,15g/lít hoặc nhiều hơn, hoặc 0,2g/lít hoặc nhiều hơn.

Lúa mạch còn được xử lý bằng proteaza sao cho sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch tăng thêm 0,3g hoặc nhiều hơn. Trong trường hợp này, lúa mạch cũng có thể được xử lý bằng proteaza sao cho sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch tăng thêm 0,6g/lít hoặc lớn hơn, 0,9g/lít hoặc lớn hơn, hoặc 1,2g/lít hoặc lớn hơn.

Lúa mạch còn được xử lý bằng proteaza sao cho sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch tăng đến 6,6g hoặc lớn hơn. Trong trường hợp này, lúa mạch cũng có thể được xử lý bằng proteaza sao cho sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch tăng đến 7,0g hoặc lớn hơn, đến 7,1g hoặc lớn hơn, hoặc đến 7,2g hoặc lớn hơn.

Việc xử lý lúa mạch bằng proteaza này có thể được thực hiện bằng cách chọn một cách thích hợp loại proteaza, và điều kiện cho phản ứng enzym bằng proteaza (ví dụ, nồng độ proteaza, nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng, hoặc độ pH của dung dịch phản ứng).

Không có giới hạn cụ thể nào đối với proteaza, chỉ cần là proteaza hoạt động trên lúa mạch, và có thể sử dụng một hoặc nhiều loại proteaza bất kỳ. Cụ thể, biết rằng proteaza còn có mặt trong lúa mạch nảy mầm, nhưng trong phương pháp theo sáng chế, có thể bổ sung proteaza (proteaza ngoại sinh), khác với proteaza trong lúa mạch nảy mầm (proteaza nội sinh). Cụ thể, proteaza để hoạt động trên lúa mạch được bổ sung theo cách ngoại sinh. Đặc biệt là, ví dụ, proteaza được sản xuất bằng cách sử

dụng vi sinh vật có thể được sử dụng. Các ví dụ về vi sinh vật để sử dụng trong sản xuất proteaza bao gồm *Aspergillus oryzae* và *Streptomyces* sp.

Đối với proteaza, tốt hơn là sử dụng proteaza làm tăng một cách hiệu quả hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế. Cụ thể, ví dụ, có thể sử dụng proteaza làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga đến 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Trong trường hợp này, proteaza làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước đến 1,2g/lít hoặc lớn hơn hoặc 1,3g/lít hoặc lớn hơn cũng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, ví dụ, proteaza làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, proteaza làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước thêm 0,1g/lít hoặc nhiều hơn, 0,15g/lít hoặc nhiều hơn, hoặc 0,2g/lít hoặc nhiều hơn cũng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, ví dụ, proteaza làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch thêm 0,3g hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, proteaza làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch thêm 0,6g/lít hoặc lớn hơn, 0,9g/lít hoặc lớn hơn, hoặc 1,2g/lít hoặc lớn hơn cũng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, ví dụ, proteaza làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch đến 6,6g hoặc lớn hơn có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, proteaza làm tăng sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch đến 7,0g hoặc lớn hơn, đến 7,1g hoặc lớn hơn, hoặc đến 7,2g hoặc lớn hơn cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ, proteaza này có thể được chọn là loại proteaza có thể đạt được hàm lượng và/hoặc sản lượng polypeptit kỵ nước nêu trên từ nhiều loại proteaza. Cụ thể, ví dụ, proteaza được ưu tiên nêu trên có thể được chọn bằng cách xử lý lúa mạch có trong nguyên liệu thô bằng proteaza tương ứng để sản xuất dung dịch lên men sơ bộ và/hoặc đồ uống có cồn có ga, và so sánh các sản lượng của polypeptit kỵ nước từ lúa mạch và/hoặc các hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với lượng proteaza cần sử dụng không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là proteaza hoạt động một cách hiệu quả trên lúa mạch, và ví dụ, lượng này có thể là 0,0025% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 0,5% trọng lượng hoặc ít hơn tính theo nguyên liệu thô lúa mạch. Trong trường hợp này, ví dụ, tỉ lệ khối lượng của proteaza tính theo nguyên liệu thô lúa mạch có thể là 0,0025% trọng lượng hoặc

nhiều hơn và nhỏ hơn 0,5% trọng lượng, có thể là 0,01% trọng lượng hoặc nhiều hơn và nhỏ hơn 0,5% trọng lượng, có thể là 0,01% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 0,4% trọng lượng hoặc ít hơn, có thể là 0,025% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 0,4% trọng lượng hoặc ít hơn, hoặc có thể là 0,05% trọng lượng hoặc nhiều hơn và 0,4% trọng lượng hoặc ít hơn.

Việc xử lý lúa mạch bằng proteaza có thể được tiến hành bằng cách trộn lúa mạch và proteaza với nước và giữ hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phù hợp cho việc xử lý enzym bằng proteaza (ví dụ, nằm trong khoảng từ 30°C đến 70°C, có thể tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30°C đến 65°C) trong khoảng thời gian định trước (ví dụ, từ 1 đến 120 phút), như được mô tả ở trên.

Cụ thể, khi lúa mạch và lúa mạch nảy mầm được sử dụng làm nguyên liệu thô lúa mạch, ví dụ, việc xử lý bằng proteaza có thể được tiến hành bằng cách trộn lúa mạch, lúa mạch nảy mầm, proteaza, và nước và giữ hỗn hợp được tạo ra ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian định trước.

Hơn nữa, khi lúa mạch và lúa mạch nảy mầm được sử dụng làm nguyên liệu thô lúa mạch, ví dụ, lúa mạch cũng có thể được xử lý bằng proteaza mà không cần được trộn với lúa mạch nảy mầm. Cụ thể, trong trường hợp này, việc xử lý bằng proteaza được tiến hành bằng cách điều chế dung dịch được trộn chứa lúa mạch và proteaza và không chứa lúa mạch nảy mầm và giữ dung dịch được trộn ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian định trước. Trong trường hợp khác, ví dụ, đầu tiên, lúa mạch, proteaza, và nước có thể được nạp vào thùng kín để tiến hành xử lý bằng proteaza, và sau đó lúa mạch nảy mầm có thể được nạp vào thùng kín.

Hơn nữa, ví dụ, trong khi lúa mạch nảy mầm và nước được nạp vào thùng kín để tiến hành đậm hóa và đường hóa, lúa mạch, proteaza, và nước được trộn để thực hiện việc xử lý bằng proteaza để tạo ra chế phẩm lúa mạch trong bình khác với thùng kín, và chế phẩm lúa mạch cũng có thể được nạp vào thùng kín.

Trong trường hợp này, thời điểm bổ sung chế phẩm lúa mạch vào lúa mạch nảy mầm có thể là thời điểm bất kỳ trước khi bắt đầu quá trình lên men, sẽ được mô tả sau. Cụ thể, ví dụ, chế phẩm lúa mạch có thể được trộn với lúa mạch nảy mầm ở thời gian sau khi đậm hóa lúa mạch nảy mầm và trước khi đường hóa, ở thời điểm bất kỳ trong quá trình đường hóa, ở thời gian sau khi đường hóa và trước khi lọc, ở thời gian sau

khi lọc và trước khi đun sôi, hoặc ở thời gian sau khi đun sôi và trước khi bắt đầu lên men. Hơn nữa, trong bất kỳ trường hợp nào, proteaza có thể được bất hoạt ở thời điểm bất kỳ. Cụ thể, ví dụ, proteaza trong chế phẩm lúa mạch có thể được bất hoạt trước bằng cách gia nhiệt chế phẩm lúa mạch trước khi bổ sung chế phẩm này vào lúa mạch nảy mầm. Hơn nữa, khi gia nhiệt cho chế phẩm lúa mạch được bổ sung vào lúa mạch nảy mầm đến nhiệt độ mà proteaza được bất hoạt, trong bước đường hóa hoặc tương tự, chế phẩm lúa mạch chứa proteaza mà không được bất hoạt cũng có thể được bổ sung.

Khi xử lý lúa mạch bằng proteaza mà không được trộn với lúa mạch nảy mầm, có thể xử lý một cách chọn lọc lúa mạch bằng proteaza để tạo ra một cách hiệu quả polypeptit kỵ nước, và tránh được một cách hiệu quả ảnh hưởng của proteaza đối với lúa mạch nảy mầm. Hơn nữa, trong trường hợp này, hiệu quả lọc của dung dịch nguyên liệu thô cũng có thể được cải thiện.

Hơn nữa, bước lên men sơ bộ 10 có thể bao gồm bước xử lý lúa mạch, bước xử lý lúa mạch nảy mầm, và bước trộn nêu trên. Trong trường hợp này, trong bước lên men sơ bộ 10, bước xử lý lúa mạch sử dụng bể thứ nhất và bước xử lý lúa mạch nảy mầm sử dụng bể thứ hai được tiến hành song song, và chế phẩm lúa mạch được xử lý trong bước xử lý lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm được xử lý trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm được trộn để tạo ra dung dịch lên men sơ bộ trong bước trộn.

Hơn nữa, như được mô tả ở trên, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza có thể được tiến hành ở nhiệt độ thứ nhất, và việc xử lý lúa mạch nảy mầm với enzym có thể được tiến hành ở nhiệt độ thứ hai là khác với nhiệt độ thứ nhất. Cụ thể, ví dụ, khi nhiệt độ thứ hai thấp hơn so với nhiệt độ thứ nhất, chế phẩm lúa mạch được giữ ở nhiệt độ thứ nhất trong bước xử lý lúa mạch, chế phẩm lúa mạch nảy mầm được giữ ở nhiệt độ thứ hai trong bước xử lý lúa mạch nảy mầm, và trộn chế phẩm lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm, và hỗn hợp được tạo ra được giữ thêm ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn so với nhiệt độ thứ nhất.

Như được mô tả ở trên, nhờ thực hiện một cách độc lập việc xử lý lúa mạch và việc xử lý lúa mạch nảy mầm lần lượt trong bể thứ nhất và bể thứ hai, có thể xử lý một cách đầy đủ lúa mạch bằng proteaza ngoại sinh để tạo ra một cách hiệu quả polypeptit

ky nước, và xử lý một cách thích hợp lúa mạch nảy mầm bằng enzym nội sinh trong khi chắc chắn tránh được ảnh hưởng của proteaza ngoại sinh lên lúa mạch nảy mầm.

Cụ thể, ví dụ, việc xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym trong bể thứ hai được thực hiện một cách chắc chắn trong khoảng nhiệt độ tương đối hẹp (ví dụ, 45°C hoặc cao hơn và thấp hơn 60°C) phù hợp cho quá trình đậm hóa, trong khi việc xử lý lúa mạch bằng proteaza trong bể thứ nhất có thể được thực hiện trong khoảng nhiệt độ rộng (ví dụ, nằm trong khoảng từ 30°C đến 70°C) tùy thuộc vào các đặc tính mong muốn cần đem lại cho đồ uống có cồn có ga cần được sản xuất cuối cùng. Chất lượng và lượng thành phần (ví dụ, hợp chất chứa nitơ như axit amin và peptit) được chiết xuất từ lúa mạch có thể được kiểm soát tùy thuộc vào nhiệt độ mà lúa mạch được xử lý. Cụ thể, trong khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 70°C, polypeptit ky nước có thể được tạo ra một cách hiệu quả từ lúa mạch, và việc chiết thành phần tạo mùi từ lúa mạch có thể được kiểm soát trong khoảng nhiệt độ ưu tiên.

Đặc biệt là, ví dụ, đồ uống có cồn có ga có hương vị đậm đà có thể được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza ở nhiệt độ tương đối thấp (ví dụ, khoảng 50°C). Hơn nữa, ví dụ, đồ uống có cồn có ga mà dễ uống và có mùi dễ chịu có thể được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza ở nhiệt độ tương đối cao (ví dụ, khoảng 65°C).

Do đó, đồ uống có cồn có ga có cả đặc tính bọt và đặc tính mùi mong muốn tuyệt vời có thể được sản xuất một cách chắc chắn và có hiệu quả bằng cách tiến hành việc xử lý lúa mạch và việc xử lý lúa mạch nảy mầm lần lượt trong bể thứ nhất và bể thứ hai một cách độc lập.

Hơn nữa, dung dịch lên men sơ bộ có thể được điều chế một cách hiệu quả, mà không gây ra, ví dụ, vấn đề bất kỳ trong chế phẩm lúa mạch sau khi xử lý và chế phẩm lúa mạch nảy mầm sau khi xử lý, bằng cách tiến hành bước xử lý lúa mạch và bước xử lý lúa mạch nảy mầm song song, và tiến hành bước trộn là bước liên tục sau các bước này.

Cụ thể, nếu chế phẩm lúa mạch sau khi xử lý lúa mạch bằng proteaza tạm thời được bảo quản ở nhiệt độ thấp, thì vấn đề như nhiễm bẩn có thể xuất hiện trong chế phẩm lúa mạch. Nếu chế phẩm lúa mạch được làm đặc để tránh được vấn đề nhiễm bẩn, ví dụ, thành phần để cải thiện các đặc tính bọt trong chế phẩm lúa mạch có thể kết

tủa nhờ làm đặc. Để làm mát một cách đầy đủ chế phẩm lúa mạch, cần có thiết bị và thời gian để làm mát, dẫn đến vấn đề về giá thành và tính hiệu quả. Nếu chế phẩm lúa mạch được đun sôi, thành phần để cải thiện các đặc tính bột trong chế phẩm lúa mạch có thể kết tủa.

Ngược lại, có thể chắc chắn tránh được vấn đề nêu trên bằng cách thực hiện việc trộn chế phẩm lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm là thao tác liên tục tiếp sau việc xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm với enzym.

Hơn nữa, như được mô tả ở trên, nhờ việc trộn chế phẩm lúa mạch với chế phẩm lúa mạch nảy mầm bằng cách chuyển một trong số chế phẩm lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm từ một trong số bể thứ nhất và bể thứ hai vào bể còn lại, có thể thực hiện thao tác trộn một cách đơn giản và hiệu quả bằng cách sử dụng thiết bị để sản xuất đồ uống có cồn có ga như bia.

Nên lưu ý rằng, việc xử lý bằng enzym (ví dụ, xử lý bằng proteaza, đạm hóa, hoặc đường hóa) trong bước lên men sơ bộ 10 có thể được thực hiện mà không cần đun sôi dung dịch chứa nguyên liệu thô (còn được gọi là phương pháp pha loãng), hoặc cũng có thể được thực hiện bằng cách đun sôi một phần dung dịch chứa nguyên liệu thô (được gọi là phương pháp sắc).

Như được mô tả ở trên, dung dịch lên men sơ bộ chứa polypeptit kỵ nước thu được từ lúa mạch được điều chế trong bước lên men sơ bộ 10. Cụ thể, dung dịch lên men sơ bộ chứa, ví dụ, polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn. Trong trường hợp này, dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,2g/lít hoặc lớn hơn hoặc 1,3g/lít hoặc lớn hơn.

Hơn nữa, dung dịch lên men sơ bộ chứa, ví dụ, polypeptit kỵ nước có hàm lượng tăng thêm 0,05g/lít hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Trong trường hợp này, dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa polypeptit kỵ nước có hàm lượng tăng thêm 0,1g/lít hoặc nhiều hơn, 0,15g/lít hoặc nhiều hơn, hoặc 0,2g/lít hoặc nhiều hơn.

Hơn nữa, dung dịch lên men sơ bộ chứa, ví dụ, polypeptit kỵ nước mà sản lượng nó trên mỗi kg lúa mạch tăng thêm 0,3g hoặc nhiều hơn bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Trong trường hợp này, dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa

polypeptit kỵ nước mà sản lượng của nó trên mỗi kg lúa mạch tăng thêm 0,6g/lít hoặc lớn hơn, 0,9g/lít hoặc lớn hơn, hoặc 1,2g/lít hoặc lớn hơn.

Hơn nữa, dung dịch lên men sơ bộ chứa, ví dụ, polypeptit kỵ nước thu được với lượng 6,6g hoặc nhiều hơn trên mỗi kg lúa mạch bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Trong trường hợp này, dung dịch lên men sơ bộ cũng có thể chứa polypeptit kỵ nước thu được với lượng 7,0g hoặc nhiều hơn, 7,1g hoặc nhiều hơn, hoặc 7,2g hoặc nhiều hơn trên mỗi kg lúa mạch.

Trong bước lên men 20, tiến hành lên men rượu bằng cách bổ sung men vào dung dịch lên men sơ bộ được điều chế trong bước lên men sơ bộ 10. Cụ thể, việc lên men sơ bộ và lên men thứ cấp (được gọi là ủ rượu) được thực hiện trong bước lên men 20.

Cụ thể là, đầu tiên, dung dịch lên men được điều chế bằng cách bổ sung men vào dung dịch lên men sơ bộ đã được khử trùng có nhiệt độ được điều chỉnh trước đến khoảng giá trị định trước (ví dụ, giá trị nằm trong khoảng từ 0°C đến 20°C). Không có giới hạn cụ thể nào đối với nấm men không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là nấm men này có thể tiến hành việc lên men rượu, và dạng bất kỳ của nó có thể được chọn một cách thích hợp và được sử dụng. Cụ thể, ví dụ, tốt hơn là có thể sử dụng men bia như men lên men đáy hoặc men lên men đỉnh. Mật độ nấm men trong dung dịch lên men ở thời điểm bắt đầu lên men có thể được điều chỉnh một cách thích hợp đến, ví dụ, giá trị nằm trong khoảng từ 1×10^6 tế bào/mL đến 3×10^7 tế bào/mL.

Sau đó, dung dịch lên men được giữ ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian định trước để tiến hành việc lên men sơ bộ. Nhiệt độ lên men sơ bộ có thể được điều chỉnh một cách thích hợp đến, ví dụ, giá trị nằm trong khoảng từ 6°C đến 25°C. Trong quá trình lên men sơ bộ, nấm men tiến hành hoạt tính chuyển hóa như lên men rượu trong khi tiêu thụ nguồn nitơ và nguồn cacbon có trong dung dịch lên men sơ bộ, và nguồn dinh dưỡng như các vitamin và khoáng chất được bổ sung, nếu cần. Kết quả là, trong dung dịch lên men, etanol, khí cacbon dioxit, và các thành phần tạo mùi (như các este) được tạo ra nhờ nấm men.

Tiến hành ủ rượu bằng cách giữ thêm dung dịch sau lên men khi lên men sơ bộ ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian định trước. Nhiệt độ ủ rượu có thể được điều chỉnh thích hợp đến, ví dụ, nhiệt độ nằm trong khoảng từ -3°C đến 25°C. Quá

trình ủ rượu có thể làm kết tủa thành phần không hòa tan trong dung dịch lên men để loại độ đục, và có thể cải thiện hương vị nhờ quá trình chín rượu. Hơn nữa, trong quá trình ủ rượu, có thể hòa tan thêm khí cacbon dioxit trong dung dịch lên men.

Do đó, trong bước lên men 20, có thể thu được dung dịch sau lên men chứa etanol và các thành phần tạo hương vị được tạo ra nhờ nấm men. Nồng độ etanol có trong dung dịch sau lên men có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1% đến 20% thể tích, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1% đến 10% thể tích.

Trong bước sau lên men 30, cuối cùng thu được đồ uống có cồn có ga bằng cách đưa dung dịch sau lên men được tạo ra như được mô tả ở trên vào quy trình xử lý định trước. Một cách xử lý của bước sau lên men 30 là, ví dụ, nấm men có trong dung dịch sau lên men có thể được loại bỏ bằng cách lọc dung dịch sau lên men.

Trong khi đó, trong bước sau lên men 30, dung dịch sau lên men được đưa vào khử trùng ở nhiệt độ thấp bằng cách giữ dung dịch sau lên men ở nhiệt độ 60°C hoặc cao hơn trong thời gian 1 phút hoặc lâu hơn, hoặc khử trùng ở nhiệt độ cao bằng cách giữ dung dịch sau lên men ở nhiệt độ cao hơn trong khoảng thời gian ngắn hơn. Hơn nữa, khí cacbon dioxit có thể được bơm vào dung dịch sau lên men.

Hơn nữa, trong bước sau lên men 30, rượu mạnh có thể được bổ sung vào dung dịch sau lên men. Cụ thể, trong trường hợp này, thu được đồ uống có cồn có ga bằng cách trộn rượu mạnh với dung dịch sau lên men. Đối với rượu mạnh, tốt hơn là có thể sử dụng các loại rượu được sản xuất có sử dụng nguyên liệu thô là ngũ cốc. Cụ thể, ví dụ, có thể sử dụng rượu mạnh được chưng cất được sản xuất nhờ sử dụng, ví dụ, lúa mạch, lúa mỳ, gạo, kiều mạch, khoai tây, khoai lang, ngô, hoặc mía làm nguyên liệu thô, và tốt hơn là ưu tiên sử dụng rượu mạnh được chưng cất được sản xuất nhờ sử dụng lúa mạch hoặc lúa mỳ làm nguyên liệu thô. Nồng độ cồn có trong rượu mạnh có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 20% đến 90% thể tích.

Theo phương pháp của sáng chế, sản xuất được đồ uống có cồn có ga có các đặc tính bọt được cải thiện một cách hiệu quả. Hơn nữa, trong phương pháp theo sáng chế, có thể đẩy mạnh việc lên men bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Cụ thể, ví dụ, có thể tăng lượng chất chiết có trong dung dịch lên men sơ bộ (dịch nha). Cụ thể, tốc độ thu nhận chất chiết có thể được cải thiện. Số ngày cần thiết cho việc lên men cũng có thể được giảm. Sự sinh trưởng của nấm men cũng có thể được đẩy mạnh. Hơn

nữa, trong phương pháp theo sáng chế, thông qua việc xử lý lúa mạch bằng proteaza, mùi chưa chín của đồ uống có cồn có ga được sản xuất có thể được làm giảm một cách hiệu quả, và các hàm lượng etyl axetat và isoamyl axetat, là các thành phần tạo hương vị được ưu tiên (lượng được tạo ra nhờ nấm men), có thể tăng một cách hiệu quả.

Nên lưu ý rằng, phương pháp theo sáng chế không chỉ giới hạn ở phương pháp bao gồm bước tiến hành lên men rượu. Cụ thể, ví dụ, nếu phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất đồ uống có ga không có cồn, thì đồ uống có ga không có cồn có thể được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza để tạo ra chế phẩm lúa mạch và trộn chế phẩm lúa mạch với các thành phần khác. Hơn nữa, trong trường hợp này, các thành phần khác như chế phẩm lúa mạch nảy mầm được tạo ra bằng cách xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym và/hoặc có thể còn bổ sung thêm cao hoa hublông vào. Hơn nữa, có thể sử dụng chế phẩm được điều chế bằng cách xử lý hỗn hợp của lúa mạch và lúa mạch nảy mầm bằng proteaza và enzym bất kỳ khác. Trong phương pháp theo sáng chế, nồng độ cồn trong đồ uống có ga cũng có thể được kiểm soát tùy thuộc vào điều kiện để lên men và xử lý sau khi lên men.

Tiếp theo, tác nhân cải thiện các đặc tính bọt theo phương án này (sau đây được gọi là "tác nhân cải thiện theo sáng chế") được mô tả. Tác nhân cải thiện theo sáng chế là tác nhân cải thiện các đặc tính bọt chứa polypeptit kỵ nước làm thành phần hoạt tính. Cụ thể, theo kết quả của các nghiên cứu sâu rộng độc lập, các tác giả sáng chế mới phát hiện ra rằng polypeptit kỵ nước nêu trên có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính để cải thiện các đặc tính bọt của đồ uống có ga.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với hàm lượng polypeptit kỵ nước trong tác nhân cải thiện theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là thu được tác dụng cải thiện các đặc tính bọt.

Polypeptit kỵ nước có thể thu được, ví dụ, từ lúa mạch như được mô tả ở trên. Cụ thể, trong trường hợp này, tác nhân cải thiện theo sáng chế chứa polypeptit kỵ nước, thu được bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza, làm thành phần hoạt tính.

Tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể còn chứa polypeptit kỵ nước được phân đoạn trong sắc ký như được mô tả ở trên làm thành phần hoạt tính. Cụ thể, trong trường hợp này, polypeptit kỵ nước có thể là polypeptit thu được bằng cách phân đoạn phần ở thời gian lưu tương ứng với polypeptit kỵ nước trong sắc ký của chế phẩm lúa

mạch thu được bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza. Tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể được sản xuất, ví dụ, bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza như được mô tả ở trên.

Tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể chứa chất điều chỉnh độ pH, chất chống oxy hóa, tác nhân tạo màu, chất tạo mùi thơm, và các chất tương tự, chỉ cần là các chất này không ảnh hưởng đến tác dụng cải thiện các đặc tính bột. Hơn nữa, tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể được tạo ra thành sản phẩm với các dạng khác nhau tùy thuộc vào mục đích. Cụ thể, tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể được tạo thành, ví dụ, dạng liều ở dạng dung dịch, bột nhão, dạng bột, viên nén, hoặc viên nang.

Đặc biệt là, nếu tác nhân cải thiện theo sáng chế được sản xuất bằng cách giữ dung dịch chứa lúa mạch và proteaza ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian định trước, thì tác nhân cải thiện có thể là chế phẩm lúa mạch, là dung dịch sau khi xử lý bằng proteaza, hoặc có thể là chế phẩm được điều chế bằng cách pha loãng hoặc làm đặc dung dịch. Tác nhân cải thiện theo sáng chế cũng có thể là chế phẩm rắn thu được bằng cách làm khô chế phẩm lỏng này.

Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga sử dụng tác nhân cải thiện theo sáng chế như được mô tả ở trên. Trong trường hợp này, trong phương pháp theo sáng chế, tác nhân cải thiện theo sáng chế được bổ sung trong quá trình sản xuất đồ uống có ga. Cụ thể, phương pháp theo sáng chế có thể là, ví dụ, phương pháp sản xuất đồ uống có ga với các đặc tính bột được cải thiện bằng cách bổ sung tác nhân cải thiện theo sáng chế dưới dạng một phần nguyên liệu thô.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với thời điểm bổ sung tác nhân cải thiện theo sáng chế. Cụ thể, nếu phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất đồ uống có cồn có ga như được mô tả ở trên, thời điểm bổ sung có thể là thời điểm bất kỳ trước khi bắt đầu lên men. Đặc biệt là, tác nhân cải thiện theo sáng chế có thể được bổ sung ở thời gian sau khi đậm hóa lúa mạch nảy mầm và trước khi đường hóa, thời điểm bất kỳ trong quá trình đường hóa, thời gian sau khi đường hóa và trước khi lọc, thời gian sau khi lọc và trước khi đun sôi, hoặc thời gian sau khi đun sôi và trước khi bắt đầu lên men.

Theo phương pháp theo sáng chế, sản xuất được đồ uống có ga với các đặc tính bột được cải thiện một cách hiệu quả. Cụ thể, trong phương pháp theo sáng chế, hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có ga tăng và các đặc tính bột của đồ uống có ga được cải thiện một cách hiệu quả bằng cách bổ sung tác nhân cải thiện theo sáng chế. Nên lưu ý rằng, ví dụ, ngay cả khi đồ uống có ga không có cồn được sản xuất mà không thực hiện việc lên men, các đặc tính bột (đặc tính tạo bột, tính ổn định bột, bám dính bột, và tương tự) được cải thiện một cách hiệu quả bằng cách bổ sung tác nhân cải thiện theo sáng chế dưới dạng một phần nguyên liệu thô và để đồ uống có ga không có cồn chứa khí cacbon dioxit.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất đồ uống có cồn có ga

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp pha loãng, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza.

Loại bất kỳ trong số 7 loại proteaza sau (sau đây được gọi là "proteaza từ P1 đến P7") được sử dụng làm proteaza. Cụ thể, sử dụng proteaza P1 (Orientase 10NL được sản xuất bởi HBI Enzyms Inc.), proteaza P2 (Protin SD-PC10F được sản xuất bởi Amano Enzym Inc.), proteaza P3 (Umamizymeg được sản xuất bởi Amano Enzym Inc.), proteaza P4 (Trypsin 4.0T được sản xuất bởi HIGUCHI Inc.), proteaza P5 (Sumizyme LP50D được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), proteaza P6 (Sumizyme SP được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), hoặc proteaza P7 (Sumizyme ACP-G được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.).

Nên lưu ý rằng, 7 loại proteaza được chọn dưới dạng proteaza được ưu tiên, mỗi loại có khả năng góp phần vào việc cải thiện các đặc tính bột của đồ uống có cồn có ga trong thử nghiệm sơ bộ sử dụng 16 loại proteaza.

Cụ thể, 9 loại sau: Orientase 22BF (được sản xuất bởi HBI Enzyms Inc.), Orientase 10NL (được sản xuất bởi HBI Enzyms Inc.), Sumizyme Shochu (được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), Sumizyme P (được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), Sumizyme RPII (được sản xuất bởi Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), Biopraxe OP (được sản xuất bởi Nagase ChemteX Corporation), Aroase XA-10

(được sản xuất bởi Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), Pantidase P (được sản xuất bởi Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), và Neutrase 0,8L (được sản xuất bởi Novozymes) trong số 16 loại proteaza không được dùng do kết quả sàng lọc trong thử nghiệm sơ bộ bởi vì chúng không góp phần vào việc cải thiện tính ổn định bọt của đồ uống có cồn có ga.

Đầu tiên, nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông, chứa 830g lúa mạch (77% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), 250g lúa mạch nảy mầm (23% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), và 1,08g proteaza (0,1% trọng lượng tính theo nguyên liệu thô lúa mạch), được cho vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C để tạo ra dung dịch nguyên liệu thô. Sau đó, xử lý lúa mạch bằng proteaza và thực hiện việc đậm hóa bằng cách giữ dung dịch nguyên liệu thô ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút.

Tiếp theo, thực hiện quá trình đường hóa bằng cách giữ dung dịch nguyên liệu thô ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 60 phút. Sau đó, dung dịch nguyên liệu thô được giữ ở 75°C trong thời gian 3 phút, rồi lọc để thu được dung dịch lên men sơ bộ. Hơn nữa, gia nhiệt dung dịch lên men sơ bộ đến nhiệt độ 100°C, bổ sung 7g hoa hublông vào, và đun sôi hỗn hợp. Lọc dung dịch lên men sơ bộ sau khi đun sôi và sau đó làm mát.

Bổ sung nấm men lên men đáy vào dung dịch lên men sơ bộ được làm mát để tạo ra dung dịch lên men. Tiến hành lên men sơ bộ bằng cách giữ dung dịch lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 13°C trong khoảng thời gian định trước. Hơn nữa, tiến hành việc ủ rượu bằng cách giữ dung dịch sau lên men khi lên men sơ bộ ở nhiệt độ thấp hơn trong khoảng thời gian định trước. Lọc dung dịch sau lên men khi ủ rượu để thu được đồ uống có cồn có ga.

Hơn nữa, tạo ra đồ uống có cồn có ga làm đối chứng so sánh theo cách tương tự như cách nêu trên, ngoại trừ là không sử dụng proteaza. Do đó, sản xuất được 8 loại đồ uống có cồn có ga.

Đánh giá giá trị NIBEM

Tiến hành đo giá trị NIBEM của 8 loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất như được mô tả ở trên. Cụ thể, đầu tiên, rót mỗi loại đồ uống có cồn có ga ở nhiệt độ 20°C vào cốc tiêu chuẩn từ máy rót sử dụng khí cacbon dioxit. Sau đó, đo độ cao của bọt được tạo ra bằng cách sử dụng thiết bị đo định trước (thiết bị NIBEM-TPH được sản

xuất bởi Haffmans), và thời gian cần thiết để làm giảm độ cao của bọt đi 30mm được đánh giá là giá trị NIBEM (giây).

Sắc ký pha đảo

Phân tích đồ uống có cồn có ga, được sản xuất bằng cách sử dụng proteaza P1, P5, hoặc P7 trong số 8 loại đồ uống có cồn có ga và đồ uống có cồn có ga được sản xuất mà không sử dụng proteaza, bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao (reverse phase high performance liquid chromatography - RP-HPLC).

Cụ thể, đầu tiên, lọc đồ uống có cồn có ga, được pha loãng 2 lần bằng nước, qua thiết bị lọc bằng xylan (0,45µm xenluloza axetat). Đưa 400µL dịch lọc vào lọc ly tâm ở 9.660G trong thời gian 1 giờ sử dụng thiết bị lọc ly tâm (Microcon-3 được sản xuất bởi Millipore), loại dịch lọc thu được, bổ sung 350µL nước vào dụng cụ chứa mẫu, và đưa hỗn hợp vào lọc ly tâm theo cách tương tự lần nữa để loại các chất phân tử nhỏ có trọng lượng phân tử bằng 3.000 hoặc nhỏ hơn. Đảo ngược dụng cụ chứa mẫu và ly tâm ở 9.660G trong thời gian 5 phút để gom dung dịch được làm đặc. Bổ sung nước vào dung dịch được làm đặc để tạo ra 100µL dung dịch, mà được sử dụng làm mẫu để đưa vào phân tích.

Sau đó, phân tích 25µL mẫu sử dụng cột (mRP-C18, 4,6×50 mm, Agilent Technologies) chứa silic dioxide cỡ hạt 5µm siêu tinh khiết liên kết C18 làm chất đệm cột lọc.

Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 0,75mL/phút, và cài đặt nhiệt độ đến 80°C. Sử dụng axit trifloroaxetic 0,1% (TFA)/nước làm dung dịch đệm A, và 0,08% TFA/axetonitril được sử dụng làm dung dịch đệm B. Tỷ lệ của dung dịch đệm B được thay đổi từ 3% (0 đến 5 phút), đến từ 3% đến 30% (5 đến 32 phút), và từ 30% đến 95% (từ 32 đến 40 phút) theo thời gian. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 220nm sử dụng bước sóng tham khảo là 360nm.

Mỗi hình vẽ trong số các hình vẽ từ FIG.2A đến FIG.2D minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được. FIG.2A minh họa phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza. Mỗi hình vẽ trong số các hình vẽ từ FIG.2B đến FIG.2D minh họa phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P1, P5, hoặc P7.

Như được minh họa trên các hình vẽ từ FIG.2A đến 2D, độ cao các đỉnh của polypeptit kỵ nước (các đỉnh được nối bằng đường nét rời trên các hình vẽ) được phát hiện ở thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút tăng lên khi sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza (các hình vẽ từ FIG.2B đến FIG.2D) so với trường hợp sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza (FIG.2A). Cụ thể, khi proteaza P5 được sử dụng (FIG.2C) và khi proteaza P7 được sử dụng (FIG.2D), độ cao các đỉnh của polypeptit kỵ nước tăng rõ rệt.

Định lượng polypeptit

Phân đoạn tương ứng với thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao nêu trên, và định lượng polypeptit kỵ nước có trong phân đoạn này. Định lượng polypeptit bằng phương pháp Lowry sử dụng kit có bán trên thị trường (kit thử nghiệm DC protein được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories).

Cụ thể, đầu tiên, pha loãng mẫu được siêu lọc như được mô tả ở trên 2 lần bằng nước, và phân đoạn 100 μ L mẫu pha loãng bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao. Đặt phân đoạn phân đoạn nêu trên trong bình thót cổ đáy tròn dung tích 50mL và làm khô và rồi hóa rắn bằng thiết bị làm bay hơi (40°C, 20x10⁵ N/m²). Sau đó, bổ sung 500 μ L dung dịch chứa NaOH 0,1M và SDS 0,1% vào sản phẩm được hóa rắn, sau đó hòa tan bằng cách siêu âm trong 30 phút và nhỏ giọt bằng pipet. Pha loãng thêm dung dịch bằng dung dịch chứa NaOH 0,1M và SDS 0,1% sao cho lượng polypeptit là 1,48mg/mL hoặc nhỏ hơn, và làm khô 50 μ L dung dịch được pha loãng và rồi hóa rắn bằng thiết bị làm bay hơi có ly tâm (40°C, 1,5 giờ). Bổ sung 10 μ L nước siêu tinh khiết vào sản phẩm được hóa rắn, sau đó sản phẩm này được hòa tan trong đó.

Bổ sung 50 μ L chất phản ứng A' (được điều chế bằng cách bổ sung 20 μ L chất phản ứng S vào 1mL chất phản ứng A) vào dung dịch thu được, và hòa tan bằng cách trộn xoáy và siêu âm trong thời gian 10 phút. Hơn nữa, bổ sung 400 μ L chất phản ứng B vào dung dịch thu được và trộn toàn bộ bằng cách lắc xoáy. Sau đó, thực hiện phản ứng sinh màu ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút.

Chuyển 200 μ L mẫu sau phản ứng vào đĩa có lỗ, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 750nm sử dụng máy đọc đĩa. Hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga được tính dựa trên độ hấp thụ đo được và đường cong chuẩn được tạo từ trước.

Nên lưu ý rằng, đường cong chuẩn được tạo nhờ sử dụng albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA). Cụ thể, đầu tiên, pha loãng dung dịch chứa 1,48mg/mL BSA 0,2-, 0,4-, 0,6-, và 0,8 lần. Định lượng protein (BSA) trong hỗn hợp, thu được bằng cách trộn 10 μ L mỗi dung dịch BSA được pha loãng với 50 μ L dung dịch chứa NaOH 0,1M và SDS 0,1%, theo cách giống như trong trường hợp nêu trên.

Hơn nữa, định lượng protein 40kDa bằng phương pháp miễn dịch điện di nhanh theo tài liệu đã biết (T. Kaneko et al; Breeding science, 49(2), pp69-74 1999 and J. Hejgaard et al; J. Inst. Brew. 83, 94-96 1977).

FIG.3 minh họa sự tương quan giữa hàm lượng (g/L) của polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga được đo như được mô tả ở trên và giá trị NIBEM (giây) ở đồ uống có cồn có ga.

Như được minh họa trên FIG.3, hàm lượng polypeptit kỵ nước và giá trị NIBEM thể hiện mối liên hệ tuyến tính thỏa đáng (hệ số tương quan $R=0,94$). Cụ thể, ví dụ, theo phương trình gần như tuyến tính, đạt được sự tương quan là giá trị NIBEM tăng thêm khoảng 20 giây bằng cách làm tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga thêm 0,05g/lít.

Do đó, có thể hiểu được là việc tăng hàm lượng (nồng độ) của polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga góp phần vào việc cải thiện tính ổn định bọt (tăng giá trị NIBEM) qua việc xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Trên FIG.4, loại proteaza (từ P1 đến P7) được sử dụng để xử lý lúa mạch, hàm lượng polypeptit kỵ nước (g/L), sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch (g/kg lúa mạch), sự tăng hàm lượng polypeptit kỵ nước bằng cách sử dụng proteaza (g/L), sự tăng sản lượng polypeptit kỵ nước bằng cách sử dụng proteaza (g/kg lúa mạch), hàm lượng protein 40kDa, và giá trị NIBEM (giây) được minh họa có liên quan với nhau đối với mỗi loại trong 8 loại đồ uống có cồn có ga. Nên lưu ý rằng, sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch được tính dựa trên hàm lượng polypeptit kỵ nước trong đồ uống có cồn có ga (g/L), khối lượng lúa mạch được sử dụng để sản xuất đồ uống có cồn có ga (g), và thể tích của đồ uống có cồn có ga được sản xuất (lít).

Hiểu rằng hiếm có sự khác biệt bất kỳ nào ở các hàm lượng polypeptit kỵ nước và protein giữa dung dịch lên men sơ bộ và đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng dung dịch lên men sơ bộ.

Như được minh họa trên FIG.4, hàm lượng polypeptit kỵ nước (g/L) tăng thêm 0,1g/lít hoặc nhiều hơn so với hàm lượng (1,04 g/L) khi lúa mạch không được xử lý bằng proteaza và tăng đến 1,1g/lít hoặc lớn hơn (từ 1,15 đến 1,48 g/L) bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P3 đến P7. Trong khi đó, khi xử lý lúa mạch bằng proteaza P1 hoặc P2, hàm lượng polypeptit kỵ nước giảm.

Hơn nữa, giá trị NIBEM (giây) tăng thêm 30 giây hoặc lâu hơn so với giá trị NIBEM (262 giây) khi lúa mạch không được xử lý bằng proteaza, và tăng đến 300 giây hoặc lâu hơn (từ 301 giây đến 468 giây) bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P3 đến P7.

Cụ thể, khi proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P5 đến P7 được sử dụng, hàm lượng polypeptit kỵ nước tăng thêm 0,2g/lít hoặc nhiều hơn, và giá trị NIBEM cũng tăng thêm 100 giây hoặc lâu hơn và tăng đến 350 giây hoặc lâu hơn (từ 354 giây đến 468 giây).

Hơn nữa, sản lượng polypeptit kỵ nước trên mỗi kg lúa mạch (g/kg lúa mạch) tăng thêm 0,6 (g/kg lúa mạch) hoặc nhiều hơn so với sản lượng (6,27 (g/kg lúa mạch)) khi lúa mạch không được xử lý bằng proteaza, và tăng đến 6,9 (g/kg lúa mạch) hoặc nhiều hơn (6,93 đến 8,92 (g/kg lúa mạch)) bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P3 đến P7.

Cụ thể, khi proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P5 đến P7 được sử dụng, sản lượng polypeptit kỵ nước tăng thêm 1,0 (g/kg lúa mạch) hoặc nhiều hơn và tăng đến 7,4 (g/kg lúa mạch) hoặc nhiều hơn (từ 7,47 đến 8,92 (g/kg lúa mạch)).

Trong khi đó, hàm lượng protein 40kDa trong đồ uống có cồn có ga (mg/L) là, ví dụ, 259mg/L trong trường hợp bất kỳ trong số các trường hợp trong đó giá trị NIBEM là 252 giây (proteaza P2 được sử dụng), trong đó giá trị NIBEM là 354 giây (proteaza P6 được sử dụng), và trong đó giá trị NIBEM là 468 giây (proteaza P7 được sử dụng). Cụ thể, không quan sát thấy sự tương quan rõ rệt như trong trường hợp của polypeptit kỵ nước được mô tả ở trên giữa hàm lượng protein 40kDa và giá trị NIBEM.

Hơn nữa, các đánh giá cảm quan đối với mỗi loại trong số 8 loại đồ uống có cồn có ga được tiến hành bởi các chuyên gia trong nhóm tham gia. Kết quả là, thu được đánh giá toàn diện là mùi và vị là tuyệt vời, đặc biệt là đối với đồ uống có cồn có ga

được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P5 đến P7.

Phân tích chế phẩm axit amin

Phân tích 6 loại, tức là, đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng proteaza P1, P4, P5, P6 hoặc P7 và đồ uống có cồn có ga được sản xuất mà không sử dụng proteaza, trong số 8 loại đồ uống có cồn có ga bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao theo cách tương tự như trong phương pháp "Sắc ký pha đảo" nêu trên.

Ngoài ra, các phân đoạn tương ứng với thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao được phân đoạn theo cách tương tự như cách mô tả trong phần "Định lượng polypeptit" nêu trên. Sau đó, làm khô và hóa rắn phần được phân đoạn bằng thiết bị làm bay hơi. Hòa tan sản phẩm hóa rắn trong 1mL dung dịch etanol 20%, và sử dụng từ 40μL đến 200μL dung dịch làm mẫu để phân tích chế phẩm axit amin.

Mẫu được đặt trong ống nghiệm và làm khô và rồi hóa rắn trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung 200μL axit clohydric ở nồng độ 6mol/L vào sản phẩm được hóa rắn. Thay pha khí trong ống nghiệm bằng nitơ, và ống nghiệm được bịt kín ở điều kiện áp suất giảm. Tiến hành thủy phân bằng cách gia nhiệt ống nghiệm ở 110°C trong thời gian 22 giờ. Tiếp theo, làm khô dung dịch trong ống nghiệm và rồi hóa rắn ở điều kiện áp suất giảm. Bổ sung 200μL axit clohydric ở nồng độ 0,02mol/L vào sản phẩm được hóa rắn, sau đó hòa tan. Lọc dung dịch thu được qua thiết bị lọc ly tâm cỡ 0,22μm để thu được dung dịch mẫu.

Phân tích 25μL dung dịch mẫu bằng cách sử dụng thiết bị phân tích axit amin (Model L-8800 A được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.). Điều kiện phân tích chất lưu sinh học/phương pháp ninhydrin được dùng làm điều kiện đo. Cài đặt bước sóng dò đối với prolin đến 440nm, và cài đặt bước sóng dò đối với các axit amin khác với prolin đến 570nm.

FIG.5 minh họa kết quả phân tích chế phẩm axit amin đối với mỗi loại trong 6 loại đồ uống có cồn có ga. Cụ thể, FIG.5 minh họa loại proteaza được sử dụng để sản xuất từng đồ uống có cồn có ga và tỷ lệ hàm lượng (% mol) của mỗi axit amin. Hàm lượng polypeptit kỵ nước (g/L) và giá trị NIBEM (giây) được minh họa trên FIG.4 như được mô tả ở trên cũng được minh họa lần nữa để tham khảo.

Như được minh họa trên FIG.5, hàm lượng prolin (nằm trong khoảng từ 14,60% đến 23,04% mol) đặc biệt cao rõ rệt trong polypeptit kỵ nước được phân đoạn từ 5 loại đồ uống có cồn có ga sản xuất được bằng cách sử dụng proteaza so với hàm lượng (10,02 % mol) trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất mà không sử dụng proteaza. Tuy nhiên, về vấn đề này, trong đồ uống có cồn có ga sử dụng proteaza P2, như được minh họa trên FIG.4, hàm lượng polypeptit kỵ nước thấp đến mức 0,91g/L, và giá trị NIBEM là nhỏ ở mức 252 giây.

Do đó, 4 loại đồ uống có cồn có ga sản xuất được bằng cách sử dụng proteaza bất kỳ trong số các proteaza từ P4 đến P7 và có các giá trị NIBEM cao trong số 6 loại được minh họa trên FIG.5, đạt được tính ổn định bọt rất tuyệt vời có lẽ là vì hàm lượng polypeptit kỵ nước là 1,1g/lít hoặc lớn hơn và hàm lượng prolin của polypeptit kỵ nước là 13,5% mol hoặc lớn hơn (nói cách khác, nhờ chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc lớn hơn có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn).

Sắc ký lọc gel

Phân tích đồ uống có cồn có ga, được sản xuất bằng cách sử dụng proteaza P1, P5, hoặc P7 và đồ uống có cồn có ga được sản xuất mà không sử dụng proteaza, trong số 8 loại đồ uống có cồn có ga, bằng sắc ký lọc gel.

Cụ thể, 100 μ L mỗi loại đồ uống có cồn có ga được phân tích sử dụng cột lọc gel (Superdex 75 10/300GL, được sản xuất bởi GE Healthcare Japan). Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 0,5mL/phút. Dung dịch đệm phosphat 50mM (pH 7,0, dung dịch NaCl 150mM) được sử dụng làm dung dịch phát triển. Ngoài ra, đo độ hấp thụ ở bước sóng 215nm.

Mỗi hình vẽ FIG.6A và FIG.6B minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được. Phổ sắc ký được minh họa trên FIG.6A được phóng đại một phần trên FIG.6B. Trên các hình vẽ FIG.6A và FIG.6B, kết quả phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza được thể hiện bởi đường nét liền ("không có proteaza" trên hình vẽ), kết quả phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P1 được thể hiện bởi đường nét đứt hai chấm ("P1" trên hình vẽ), kết quả phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 được thể hiện bởi đường nét đứt dài ("P5" trên hình vẽ), và kết quả phân tích đồ uống có cồn có

ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P7 được thể hiện bởi đường nét đứt ("P7" trên hình vẽ).

Như được minh họa trên các hình vẽ FIG.6A và FIG.6B, độ cao các đỉnh phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút tương ứng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa tăng lên nhờ việc sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza ("P1," "P5," và "P7" trên các hình vẽ) so với trường hợp sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" trên các hình vẽ). Cụ thể, độ cao các đỉnh của các polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa là tăng rõ rệt khi proteaza P5 hoặc P7 được sử dụng.

Hơn nữa, đỉnh của polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 15kDa và đỉnh của polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kDa đến 25kDa phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút. Độ cao của 2 đỉnh này tăng rõ rệt khi sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza, và đặc biệt là khi sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 hoặc P7.

Hơn nữa, đỉnh của protein 40kDa được phát hiện quanh thời gian lưu là khoảng 24 phút. Độ cao đỉnh của protein 40kDa cũng tăng khi sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza. Tuy nhiên, không quan sát được sự tương quan rõ rệt, như với trường hợp giá trị định lượng của protein 40kDa như được mô tả ở trên.

Nên lưu ý rằng, trọng lượng phân tử được ước tính bằng cách sử dụng kit định cỡ lọc gel LMW (đối với phân tử khối lượng thấp, được sản xuất bởi GE Healthcare Ltd.) thông qua việc so sánh với thời gian lưu của aprotinin (MW 6.500), ribonucleaza A (MW 13.700), cacbonic anhydrase (MW 29.000), ovalbumin (MW 43.000), và conalbumin (MW 75.000).

Ví dụ 2: Sản xuất dung dịch lên men sơ bộ

Dung dịch lên men sơ bộ được điều chế bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza. Proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Hai dạng dung dịch lên men sơ bộ, tức là, dung dịch lên men sơ bộ chứa proteaza (0,1% trọng lượng tính theo nguyên liệu thô lúa mạch) và dung dịch lên men sơ bộ không sử dụng proteaza làm đối chứng so sánh, được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1.

Sắc ký lọc gel

Phân tích hai loại dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất như được mô tả ở trên bằng sắc ký lọc gel theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Cụ thể, 100 μ L mỗi dung dịch trong số các dung dịch lên men sơ bộ được phân tích sử dụng cột lọc gel (Superdex 75 10/300GL, được sản xuất bởi GE Healthcare Japan). Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 0,5mL/phút. Sử dụng dung dịch đệm phosphat 50mM (pH 7,0, NaCl 0,150mM) làm dung dịch phát triển. Ngoài ra, đo độ hấp thụ ở bước sóng 215nm.

Mỗi hình vẽ trong số các hình vẽ FIG.7A và FIG.7B minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được. FIG.7A minh họa kết quả phân tích dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza, và FIG.7B minh họa kết quả phân tích dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5.

Như được minh họa trên các hình vẽ FIG.7A và FIG.7B, độ cao đỉnh phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút, tương ứng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 đến 25kDa, là tăng rõ rệt nhờ sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 (FIG.7B) so với trường hợp sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza (FIG.7A).

Hơn nữa, đỉnh của polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 15kDa và đỉnh phổ sắc ký của polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kDa đến 25kDa phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút. Độ cao của 2 đỉnh này tăng rõ rệt khi sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5.

Hơn nữa, đỉnh của protein 40kDa phát hiện được với thời gian lưu là khoảng 24 phút. Độ cao đỉnh của protein 40kDa cũng tăng khi proteaza P5 được sử dụng.

Sắc ký pha đảo

Mỗi phân đoạn tương ứng với thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 28 phút (sau đây được gọi là "phân đoạn thứ nhất") và phần tương ứng với thời gian lưu nằm trong khoảng từ 28 phút đến 30 phút (sau đây được gọi là "phân đoạn thứ hai") được phân đoạn trong sắc ký lọc gel nêu trên. Cụ thể, phân đoạn thứ nhất trong nằm trong khoảng "B2" và phân đoạn thứ hai trong nằm trong khoảng "B3" được minh họa trên FIG.7A được phân đoạn từ dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza. Hơn nữa, phân đoạn thứ nhất trong nằm trong khoảng "E2" và phân đoạn thứ hai trong nằm trong khoảng "E3" được minh họa trên FIG.7B được phân đoạn từ dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5.

Ngoài ra, 500 μ L mỗi phân đoạn được đưa vào cô bằng ly tâm đến thể tích 100 μ L hoặc nhỏ hơn bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm siêu lọc ở 9.660 G. Điều chỉnh phần thu được đến thể tích 100 μ L bằng dung dịch đệm phosphat 50mM (pH 7,0, NaCl 150mM), và phân tích bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Cụ thể, 50 μ L mỗi mẫu được phân tích sử dụng cột (mRP-C18, 4,6 $\times$ 50 mm, Agilent Technologies) chứa silic dioxide cỡ hạt 5 μ m siêu tinh khiết liên kết C18 làm chất độn cột lọc.

Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 0,75mL/phút, và cài đặt nhiệt độ đến 80°C. Sử dụng axit trifloroaxetic 0,1% (TFA)/nước làm dung dịch đệm A, và 0,08% TFA/axetonitril được sử dụng làm dung dịch đệm B. Tỷ lệ của dung dịch đệm B được thay đổi từ 3% (0 đến 5 phút), đến từ 3 đến 30% (5 đến 32 phút), và từ 30 đến 95% (từ 32 đến 40 phút) theo thời gian. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 220nm sử dụng bước sóng tham khảo là 360nm.

Mỗi hình vẽ trong số các hình vẽ FIG.8A và FIG.8B minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ nhất. FIG.8A minh họa phổ sắc ký thu được từ phân tích phân đoạn thứ nhất của dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("B2" trên FIG.7A). FIG.8B minh họa phổ sắc ký thu được từ phân tích phân đoạn thứ nhất của dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("E2" trên FIG.7B).

Như được minh họa trên các hình vẽ FIG.8A và FIG.8B, hầu hết các đỉnh của các polypeptit có trong phân đoạn thứ nhất phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút, như với trường hợp của polypeptit kỵ nước phát hiện được trong Ví dụ 1 nêu trên (xem các hình vẽ từ FIG.2A đến FIG.2D).

Ngoài ra, độ cao các đỉnh của polypeptit kỵ nước có trong phân đoạn thứ nhất tăng rõ rệt nhờ sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 (FIG.8B) so với trường hợp sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza (FIG.8A).

Từ các kết quả này, có thể hiểu được là polypeptit kỵ nước được cho là đóng góp vào việc làm tăng giá trị NIBEM trong Ví dụ 1 nêu trên bao gồm các polypeptit có trong phân đoạn thứ nhất. Nên lưu ý rằng, như được minh họa trên FIG.8B, protein 40kDa được trộn trong phân đoạn thứ nhất ("protein 40kDa" trên hình vẽ), nhưng hầu hết các polypeptit kỵ nước tăng nhờ vào việc xử lý lúa mạch bằng proteaza P5 là các polypeptit không phải là protein 40kDa.

Mỗi hình vẽ trong số các hình vẽ FIG.9A và FIG.9B minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được bằng cách phân tích phân đoạn thứ hai. FIG.9A minh họa phổ sắc ký thu được từ việc phân tích phân đoạn thứ hai của dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("B3" trên FIG.7A). FIG.9B minh họa phổ sắc ký thu được từ việc phân tích phân đoạn thứ hai của dung dịch lên men sơ bộ được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("E3" trên FIG.7B).

Như được minh họa trên các hình vẽ FIG.9A và FIG.9B, hầu hết các đỉnh của các polypeptit có trong phân đoạn thứ hai được phát hiện trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút như đối với trường hợp của polypeptit kỵ nước được dò trong Ví dụ 1 nêu trên (xem các hình vẽ từ FIG.2A đến FIG.2D).

Ngoài ra, độ cao các đỉnh của polypeptit kỵ nước có trong phân đoạn thứ hai tăng rõ rệt nhờ việc sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 (FIG.9B) so với trường hợp sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza (FIG.9A).

Từ các kết quả, có thể hiểu được là polypeptit kỵ nước được cho là góp phần vào việc làm tăng giá trị NIBEM trong Ví dụ 1 nêu trên bao gồm polypeptit có trong phân đoạn thứ hai. Do đó, có thể hiểu được là polypeptit kỵ nước, sản lượng của nó

tăng do lúa mạch được xử lý bằng proteaza, bao gồm polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa được đo bằng sắc ký lọc gel.

Ví dụ 3: Xử lý phân chiết lúa mạch bằng proteaza

Chiết lúa mạch bằng nước nóng bằng cách bổ sung 1 lít nước nóng ở nhiệt độ 55°C vào 200g lúa mạch và giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 2 giờ. Tiếp theo, lọc hỗn hợp bằng giấy lọc số 2, bổ sung 1 lít nước nóng ở nhiệt độ 55°C vào phần còn lại, và lọc tiếp hỗn hợp để gom 1,2 lít dịch lọc chứa phân chiết lúa mạch.

Ngoài ra, phân chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 bằng cách bổ sung 25mg proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên vào một phần (0,6 lít) dịch lọc và giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 1 giờ. Tiếp theo, bất hoạt proteaza P5 bằng cách giữ dung dịch ở nhiệt độ 105°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó, ly tâm dung dịch ở 12.000g trong thời gian 20 phút, và gom dịch nổi. Hơn nữa, dịch nổi được cho kết tủa bằng amoni sulfat để thu được kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% và kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75%.

Hơn nữa, để làm đối chứng so sánh, một phần khác (0,6 lít) dịch lọc được nêu nêu trên được giữ ở 105°C trong thời gian 1 giờ không có tiến hành xử lý bằng proteaza. Sau đó, ly tâm dung dịch ở 12.000g trong 20 phút, và gom dịch nổi. Ngoài ra, dịch nổi được cho kết tủa bằng amoni sulfat để thu được kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% và kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75%.

Sắc ký lọc gel

Phân tích bốn loại kết tủa amoni sulfat thu được như được mô tả ở trên bằng sắc ký lọc gel theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Cụ thể, 100µL mỗi loại kết tủa amoni sulfat được phân tích bằng cách sử dụng cột lọc gel (Superdex 75 10/300GL, được sản xuất bởi GE Healthcare Japan). Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 0,5mL/phút. Sử dụng dung dịch đệm phosphat 50mM (pH 7,0, NaCl 150mM) làm dung dịch phát triển. Ngoài ra, đo độ hấp thụ ở bước sóng 215nm.

Mỗi hình vẽ FIG.10A và FIG.10B minh họa ví dụ về các phổ sắc ký thu được. FIG.10A minh họa kết quả phân tích kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40%, và FIG.10B minh họa kết quả phân tích kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75%. Trên các hình vẽ FIG.10A và FIG.10B, kết quả phân tích kết tủa amoni sulfat chứa

phần chiết lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" trên hình vẽ) được thể hiện bởi đường nét liền và kết quả phân tích của kết tủa amoni sulfat chứa phần chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("P5" trên hình vẽ) được thể hiện bởi đường nét đứt.

Như được minh họa trên FIG.10A, độ cao các đỉnh phát hiện được trong khoảng thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút tương ứng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa tăng rõ rệt nhờ việc xử lý phần chiết lúa mạch bằng proteaza ("P5" trên hình vẽ) so với trường hợp mà phần chiết lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" trên hình vẽ) trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40%.

Hơn nữa, đỉnh của protein 40kDa phát hiện được quanh thời gian lưu 24 phút, và độ cao đỉnh của protein 40kDa cũng tăng nhờ việc xử lý phần chiết lúa mạch bằng proteaza P5.

Trong khi đó, như được minh họa trên FIG.10B, độ cao các đỉnh phát hiện được trong thời gian lưu nằm trong khoảng từ 26 phút đến 30 phút tương ứng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa cũng tăng rõ rệt nhờ việc xử lý phần chiết lúa mạch bằng proteaza ("P5" trên hình vẽ) so với trường hợp mà phần chiết lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" trên hình vẽ) trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75%. Tuy nhiên, về vấn đề này, độ cao các đỉnh của các polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa giảm rõ rệt so với độ cao các đỉnh của kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% được minh họa trên FIG.10A.

Hơn nữa, đỉnh của protein 40kDa được phát hiện quanh thời gian lưu 24 phút, và độ cao đỉnh của protein 40kDa cũng tăng nhờ việc xử lý phần chiết lúa mạch bằng proteaza P5. Ngoài ra, độ cao đỉnh của protein 40kDa cũng giảm so với độ cao của kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% được minh họa trên FIG.10A, nhưng mức độ giảm là nhỏ hơn so với mức độ giảm ở các polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa nêu trên.

Nên lưu ý rằng, biết rằng LTP1, được biết đến là protein mà cải thiện các đặc tính bột của bia, như với protein 40kDa, không có trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% nhưng có trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75% dựa trên

nguyên lý kết tủa của amoni sulfat (ví dụ, tài liệu đã biết: Kresten Lindorff-Larsen et al., The Journal of Biological Chemistry, 276, 33547-33553 (2001), tài liệu đã biết: Stanislava Gorjanovic et al., J. Inst. Brew. 111(2), 99-104, 2005).

Đánh giá giá trị NIBEM

Đánh giá ảnh hưởng của 4 loại kết tủa amoni sulfat nêu trên lên giá trị NIBEM của bia. Cụ thể, bổ sung 30mL kết tủa bất kỳ trong số các kết tủa amoni sulfat vào 633mL bia có giá trị NIBEM bằng 274 giây. Ngoài ra, giá trị NIBEM của bia sau khi bổ sung được đo theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Kết quả là, giá trị NIBEM của bia tăng thêm 19,7 giây nhờ việc bổ sung kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% chứa phần chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("P5" được minh họa trên FIG.10A) vào bia. Trong khi đó, giá trị NIBEM của bia giảm đi 16,8 giây do việc bổ sung kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% chứa phần chiết lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" được minh họa trên FIG.10A) vào bia.

Hơn nữa, giá trị NIBEM của bia lần lượt giảm đi 11,3 giây và 18,8 giây khi bổ sung kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75% chứa phần chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("P5" được minh họa trên FIG.10B) vào bia và khi bổ sung kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75% chứa phần chiết lúa mạch không được xử lý bằng proteaza ("không có proteaza" được minh họa trên FIG.10B) vào bia.

Cụ thể, chỉ kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% chứa phần chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5 ("P5" được minh họa trên FIG.10A) cải thiện một cách rõ rệt tính ổn định bọt của bia. Như được mô tả ở trên, LTP1 không có trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40%, và hàm lượng protein 40kDa trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 40% đến 75% không khác nhiều so với hàm lượng của nó trong kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40%. Do đó, có thể hiểu được là polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 25kDa, hàm lượng của nó tăng rõ rệt nhờ việc xử lý bằng proteaza P5, góp phần vào tác dụng cải thiện tính ổn định bọt đặc biệt là đối với kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 0% đến 40% chứa phần chiết lúa mạch được xử lý bằng proteaza P5.

Ví dụ 4: Sản xuất dung dịch lên men sơ bộ

Dung dịch lên men sơ bộ được điều chế bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza. Proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Hai loại dung dịch lên men sơ bộ, tức là, dung dịch lên men sơ bộ chứa proteaza (0,01% trọng lượng tính theo nguyên liệu thô lúa mạch) và dung dịch lên men sơ bộ không sử dụng proteaza làm đối chứng so sánh, được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1. Ngoài ra, mỗi dung dịch lên men sơ bộ được cho kết tủa bằng amoni sulfat để thu được kết tủa amoni sulfat bão hòa từ 25% đến 40%.

Sắc ký trao đổi cation

Phân tích kết tủa amoni sulfat thu được như được mô tả ở trên bằng sắc ký trao đổi cation. Cụ thể, 5mL kết tủa amoni sulfat được phân tích sử dụng cột trao đổi cation (HiTrap SP 5mL HP, được sản xuất bởi GE Healthcare Japan). Cài đặt tốc độ dòng chảy đến 2mL/phút, sử dụng dung dịch đệm xitrat 50mM (pH 4,2) làm dung dịch đệm A, và dung dịch đệm xitrat 50mM (pH 6,2) làm dung dịch đệm B. Ngoài ra, đo độ hấp thụ ở mỗi bước sóng 215nm và 280nm.

FIG.11 minh họa ví dụ về phổ sắc ký thu được. Trên FIG.11, polypeptit phát hiện được ở bước sóng 215nm được thể hiện bởi đường nét liền ("215nm" trên hình vẽ), polypeptit phát hiện được ở bước sóng 280nm được thể hiện bởi đường nét đứt dài ("280nm" trên hình vẽ), và sự thay đổi của độ pH được thể hiện bởi đường nét đứt ("pH" trên hình vẽ).

Như được minh họa trên FIG.11, phân đoạn không được hấp thụ (đỉnh của nó được phát hiện trong khoảng giá trị "không hấp thụ (C7)" trên hình vẽ) và phân đoạn được hấp thụ (đỉnh của nó được phát hiện trong khoảng giá trị "hấp thụ (D4 đến E2)" trên hình vẽ) có trong các polypeptit có trong kết tủa amoni sulfat thu được từ dung dịch lên men sơ bộ. Điểm đẳng điện (pI) của polypeptit có trong phân đoạn được hấp thụ dường như là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,4. Nên lưu ý rằng, điểm đẳng điện của LTP1 được biết là lớn hơn 9 (tài liệu đã biết: Stanislava Gorjanovic et al., J. Inst. Brew. 111 (2), 99-104, 2005). Cụ thể, polypeptit có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,4, ít nhất là khác với LTP1, có trong kết tủa amoni sulfat.

Đánh giá giá trị NIBEM

Polypeptit có trong phân đoạn không được hấp thụ và polypeptit có trong phân đoạn được hấp thụ nêu trên được đánh giá về ảnh hưởng của chúng đến giá trị NIBEM của bia. Cụ thể, đầu tiên, phân đoạn không được hấp thụ và phân đoạn được hấp thụ được phân đoạn từng phần trong sắc ký trao đổi cation được mô tả nêu trên. Ngoài ra, 35mL bất kỳ trong số các phân đoạn được bổ sung vào 633mL bia có giá trị NIBEM bằng 267 giây. Ngoài ra, giá trị NIBEM của bia sau khi bổ sung được đo theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Kết quả là, giá trị NIBEM của bia này là tăng thêm 17 giây bằng cách bổ sung phân đoạn được hấp thụ ("hấp thụ (D4 đến E2)" được minh họa trên FIG.11) vào bia. Trong khi đó, giá trị NIBEM của bia là tăng thêm 10 giây bằng cách bổ sung phân đoạn không được hấp thụ ("không hấp thụ (C7)" được minh họa trên FIG.11) vào bia.

Do đó, có thể hiểu được là polypeptit có trong phân đoạn được hấp thụ và có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,4 đóng góp vào việc cải thiện rõ rệt tính ổn định bọt của bia nhờ việc bổ sung phân đoạn được hấp thụ. Trong khi đó, cũng có thể hiểu là polypeptit có trong phân đoạn không được hấp thụ phần nào góp phần vào việc cải thiện tính ổn định bọt của bia.

Ví dụ 5: Sản xuất đồ uống có cồn có ga

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Proteaza P5 (có chuẩn độ là 50.000 U/g) được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Lượng proteaza được bổ sung tính theo nguyên liệu thô lúa mạch được ấn định đến 0,0025% trọng lượng (0,0033% trọng lượng lúa mạch), 0,005% trọng lượng (0,0066% trọng lượng lúa mạch), 0,01% trọng lượng (0,013% trọng lượng lúa mạch), 0,025% trọng lượng (0,033% trọng lượng lúa mạch), 0,05% trọng lượng (0,066% trọng lượng lúa mạch), 0,1% trọng lượng (0,13% trọng lượng lúa mạch), 0,25% trọng lượng (0,33% trọng lượng lúa mạch), hoặc 0,5% trọng lượng (0,66% trọng lượng lúa mạch).

Đầu tiên, dung dịch nguyên liệu thô được điều chế bằng cách bổ sung nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông, chứa 830g lúa mạch (77% trọng lượng nguyên liệu thô

lúa mạch), 250g lúa mạch nảy mầm (23% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), và proteaza với lượng là lượng bất kỳ trong số các lượng của 8 loại proteaza theo % trọng lượng so với nguyên liệu thô lúa mạch, vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C.

Ngoài ra, sản xuất được 8 loại đồ uống có cồn có ga theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Hơn nữa, đồ uống có cồn có ga làm đối chứng so sánh được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trên, ngoại trừ việc không sử dụng proteaza. Do đó, sản xuất được 9 loại đồ uống có cồn có ga.

Đánh giá giá trị NIBEM và độ bám dính bột

Giá trị NIBEM của mỗi loại trong số 9 loại đồ uống có cồn có ga sản xuất được như được mô tả nêu trên được đo theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Hơn nữa, độ bám dính bột là một trong số các đặc tính bột của mỗi loại trong số 9 loại đồ uống có cồn có ga được đánh giá bằng cách sử dụng thiết bị đo có bán trên thị trường (Nibem Cling Meter được sản xuất bởi Haffmans). Cụ thể, đồ uống có cồn có ga được rót vào trong cốc, và sau khoảng thời gian định trước trôi qua để phá vỡ bột, quét quang học bề mặt cốc mà bột bám dính vào. Đánh giá tỷ lệ vùng của phần được phủ bột tính theo tổng diện tích được quét làm độ bám dính bột (%). Khi độ bám dính bột (%) cao hơn, khả năng bám dính bột của đồ uống có cồn có ga là tốt hơn.

FIG.12 minh họa kết quả đánh giá giá trị NIBEM (giây) và độ bám dính bột (%) đối với mỗi loại trong số 9 loại đồ uống có cồn có ga với các lượng proteaza được bổ sung khác nhau (% trọng lượng).

Như được minh họa trên FIG.12, giá trị NIBEM có khuynh hướng tăng do lượng proteaza được bổ sung tăng. Tuy nhiên, về vấn đề này, khi lượng proteaza được bổ sung là 0,5% trọng lượng, giá trị NIBEM là thấp hơn so với giá trị NIBEM khi proteaza không được bổ sung (“không bổ sung” trên hình vẽ).

Trong khi đó, độ bám dính bột có khuynh hướng hơi giảm khi lượng proteaza được bổ sung là nhỏ, nhưng độ bám dính bột có khuynh hướng tăng khi lượng proteaza được bổ sung là tăng thêm 0,05% trọng lượng hoặc nhiều hơn.

Định lượng polypeptit

Phân tích đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng proteaza P5 với lượng 0,05% trọng lượng hoặc 0,25% trọng lượng, và đồ uống có cồn có ga được

sản xuất không sử dụng proteaza, trong số 9 loại đồ uống có cồn có ga, bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Ngoài ra, phân đoạn tương ứng với thời gian lưu nằm trong khoảng từ 20 phút đến 38 phút chứa polypeptit kỵ nước, và định lượng polypeptit có trong phần đó theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Trên FIG.13, lượng proteaza P5 được bổ sung (% trọng lượng) được sử dụng để xử lý lúa mạch, hàm lượng polypeptit kỵ nước (g/L), và giá trị NIBEM (giây) trong đồ uống có cồn có ga đối với mỗi loại trong số 3 loại đồ uống có cồn có ga được minh họa có liên quan với nhau. Như được minh họa trên FIG.13, các hàm lượng polypeptit kỵ nước và giá trị NIBEM trong đồ uống có cồn có ga tăng rõ rệt nhờ việc tăng lượng proteaza được bổ sung.

Đánh giá cảm quan

Đánh giá cảm quan đối với mỗi loại trong số 9 loại đồ uống có cồn có ga được tiến hành bởi 8 chuyên gia. Cụ thể, nhiều thông số về mùi, vị, và các thông số khác của đồ uống có cồn có ga được đánh giá một cách toàn diện và được các chuyên gia cho điểm.

FIG.14 minh họa kết quả đánh giá cảm quan. Trên FIG.14, trục thẳng đứng là điểm số dựa trên đánh giá thu được trong đánh giá cảm quan. Điểm số cao hơn có nghĩa là đạt được sự đánh giá tốt hơn. Đánh giá cảm quan của đồ uống có cồn có ga được cải thiện bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza như được minh họa trên FIG.14. Tuy nhiên, về vấn đề này, khi lượng proteaza được bổ sung là 0,5% trọng lượng, kết quả đánh giá là thấp hơn so với kết quả đánh giá khi proteaza không được bổ sung (“không bổ sung” trên hình vẽ).

Nên lưu ý rằng, ngoài kết quả được nêu nêu trên, khẳng định rằng đạt được hiệu quả dưới đây nhờ việc sử dụng proteaza. Cụ thể, ví dụ, lượng phần chiết có trong dung dịch lên men sơ bộ (dịch nha) tăng khi lượng proteaza được bổ sung tăng. Cụ thể, tỉ lệ đạt được phần chiết được cải thiện bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Hơn nữa, số ngày lên men (số ngày từ khi bắt đầu lên men có sự bổ sung nấm men cho đến khi nồng độ phần chiết trong dung dịch lên men giảm đến mức nhỏ hơn hoặc bằng giá trị định trước) là 6 ngày nếu không bổ sung proteaza và nếu lượng proteaza được bổ sung là 0,0025% trọng lượng, trong khi con số này có thể được rút

ngắn hơn từ 1 ngày đến 5 ngày nếu lượng proteaza được bổ sung là 0,005% trọng lượng hoặc nhiều hơn. Hơn nữa, sự sinh trưởng của nấm men còn được thúc đẩy bằng cách bổ sung proteaza. Như được mô tả ở trên, tác dụng thúc đẩy quá trình lên men đạt được bằng cách bổ sung proteaza. Nên lưu ý rằng, lượng bọt khí xuất hiện trên mặt nước của dung dịch lên men khi lên men cũng có thể được giảm bằng cách bổ sung proteaza.

Hơn nữa, mùi chưa ngấu trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất được giảm một cách hiệu quả bằng cách bổ sung proteaza. Cụ thể, mùi chưa ngấu trong đồ uống có cồn có ga giảm rõ rệt, và các hàm lượng ethyl axetat và isoamyl axetat, là các thành phần tạo hương vị thơm, tăng nhờ việc bổ sung proteaza với lượng 0,01% trọng lượng hoặc nhiều hơn. Hơn nữa, tính ổn định độ đục của bia còn được cải thiện nhờ việc bổ sung proteaza.

Hơn nữa, hàm lượng protein 40kDa trong đồ uống có cồn có ga tăng một cách đều đều, khác với trường hợp của polypeptit kỵ nước được mô tả ở trên do lượng proteaza được bổ sung tăng, và đạt tối đa khi lượng proteaza được bổ sung là 0,5% trọng lượng.

Ví dụ 6: Sản xuất đồ uống có cồn có ga

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và/hoặc lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Tỷ lệ giữa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm trong nguyên liệu thô lúa mạch là như sau: 100% trọng lượng lúa mạch (0% trọng lượng lúa mạch nảy mầm); 77% trọng lượng lúa mạch và 23% trọng lượng lúa mạch nảy mầm; 52% trọng lượng lúa mạch và 48% trọng lượng lúa mạch nảy mầm; 32% trọng lượng lúa mạch và 68% trọng lượng lúa mạch nảy mầm; hoặc 100% trọng lượng lúa mạch nảy mầm (0% trọng lượng lúa mạch).

Đầu tiên, dung dịch nguyên liệu thô được điều chế bằng cách bổ sung nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông, chứa 1.080g nguyên liệu thô lúa mạch và 1,08g proteaza (0,1% trọng lượng tính theo nguyên liệu thô lúa mạch), vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C.

Ngoài ra, 5 loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên. Hơn nữa, 5 loại đồ uống có cồn có ga làm đối chứng so sánh được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trên ngoại trừ việc không sử dụng proteaza. Do đó, sản xuất được 10 loại đồ uống có cồn có ga.

Đánh giá giá trị NIBEM và độ bám dính bột

Giá trị NIBEM và độ bám dính bột của mỗi loại trong số 10 loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất như được mô tả ở trên được đánh giá theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 5 nêu trên.

FIG.15 minh họa kết quả đánh giá giá trị NIBEM (giây) và độ bám dính bột (%) đối với mỗi loại trong số 10 loại đồ uống có cồn có ga, mỗi loại có các tỷ lệ khác nhau giữa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm trong nguyên liệu thô lúa mạch.

Như được minh họa trên FIG.15, giá trị NIBEM, khi nguyên liệu thô lúa mạch chứa lúa mạch được sử dụng tăng nhờ việc xử lý lúa mạch bằng proteaza. Hơn nữa, tốc độ tăng của giá trị NIBEM, nhờ việc sử dụng proteaza, có khuynh hướng tăng do tỷ lệ của lúa mạch (tức là, lượng lúa mạch được sử dụng) trong nguyên liệu thô lúa mạch tăng.

Ngược lại, khi không có lúa mạch trong nguyên liệu thô lúa mạch ("0% lúa mạch" trên hình vẽ), tức là, chỉ có lúa mạch nảy mầm được sử dụng, giá trị NIBEM giảm do việc sử dụng proteaza ("0% lúa mạch+Proteaza" trên hình vẽ).

Do đó, có thể hiểu được là việc tăng giá trị NIBEM nhờ việc sử dụng proteaza là dựa trên hoạt động của proteaza trên lúa mạch, và tác dụng của proteaza có khuynh hướng được cải thiện khi lượng lúa mạch được sử dụng là tăng. Trong khi đó, độ bám dính bột được cải thiện nhờ việc sử dụng proteaza không quan trọng lượng lúa mạch được sử dụng, ngay cả khi không sử dụng lúa mạch.

Ví dụ 7: Sản xuất đồ uống có cồn có ga

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza. Tỷ lệ giữa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm trong nguyên liệu thô lúa mạch là 52% trọng lượng lúa mạch và 48% trọng lượng lúa mạch

nảy mầm. Proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng với lượng 0,1% trọng lượng tính theo nguyên liệu thô lúa mạch làm proteaza.

Đầu tiên, lúa mạch được xử lý bằng proteaza mà không được trộn với lúa mạch nảy mầm. Cụ thể, nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông và lúa mạch nảy mầm, cụ thể, 37,3kg lúa mạch và 37,3g proteaza được trộn với nước nóng ở nhiệt độ 50°C. Sau đó, lúa mạch được xử lý bằng proteaza bằng cách giữ dung dịch được trộn chứa lúa mạch và proteaza ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, proteaza hầu như được bất hoạt bằng cách giữ dung dịch được trộn ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 15 phút.

Sau đó, giữ dung dịch được trộn chứa lúa mạch và proteaza ở nhiệt độ 65°C, và bổ sung 34,5kg lúa mạch nảy mầm vào đó. Ngoài ra, quá trình đường hóa được tiến hành bằng cách giữ dung dịch được trộn thu được ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 60 phút. Lọc dung dịch nguyên liệu thô sau khi đường hóa để thu được dung dịch lên men sơ bộ. Hơn nữa, gia nhiệt dung dịch lên men sơ bộ đến nhiệt độ 100°C, bổ sung 420g hoa hublông, và đun sôi toàn bộ. Làm mát dung dịch lên men sơ bộ sau khi đun sôi.

Bổ sung nấm men lên men đáy vào dung dịch lên men sơ bộ được làm mát để tạo ra dung dịch lên men. Quá trình lên men sơ bộ được tiến hành bằng cách giữ dung dịch lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 12°C trong khoảng thời gian định trước. Hơn nữa, quá trình ủ rượu được tiến hành bằng cách giữ dung dịch sau lên men khi lên men sơ bộ ở nhiệt độ thấp hơn trong khoảng thời gian định trước. Lọc dung dịch lên men sau quá trình ủ rượu để thu được đồ uống có cồn có ga.

Hơn nữa, đồ uống có cồn có ga làm đối chứng so sánh được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trên, ngoại trừ là không sử dụng proteaza. Do đó, 2 loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất. Ngoài ra, đánh giá giá trị NIBEM của mỗi loại trong số 2 loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Kết quả là, giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza P5 là 276 giây trong khi giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất mà không xử lý lúa mạch bằng proteaza là 261 giây. Cụ thể, giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga tăng nhờ việc xử lý lúa mạch bằng proteaza mà không được trộn với lúa mạch nảy mầm, so với trường hợp lúa mạch không được xử lý bằng proteaza.

Hơn nữa, FT-3 được thực hiện làm chỉ số về tính ổn định độ mờ. Cụ thể, mỗi loại đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza (sản phẩm thử nghiệm) và đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza (sản phẩm đối chứng) được nhúng trong trong bể nước ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 3 ngày và sau đó được giữ ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 ngày. Tiếp theo, đo độ đục bằng cách sử dụng máy đo độ đục (được sản xuất bởi Haffmans, đo ánh sáng tán xạ góc 90°). Kết quả là, độ đục của sản phẩm thử nghiệm là 1,54° EBC trong khi độ đục của sản phẩm đối chứng là 4,36° EBC. Do đó, tính ổn định độ mờ của sản phẩm thử nghiệm được khẳng định là được cải thiện nhờ việc xử lý lúa mạch bằng proteaza.

Ví dụ 8: Đánh giá tính kỵ nước

Đánh giá định lượng tính kỵ nước của polypeptit kỵ nước. Cụ thể, mức độ kỵ nước được đánh giá bằng tổng các hằng số Rekker được biến đổi. (Tham khảo 1: R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977, p.301, Tài liệu tham khảo 2 Tatsuru Sasagawa et al., Prediction of Peptide Retention Times in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography during Linear Gradient elution, Journal of Chromatography 240 (1982), 329-340, Tài liệu tham khảo 3: Toshiaki Isobe, Norio Okuyama, Biophysical Chemistry Vol.30, No.1 (1986)).

Tổng các hằng số Rekker được biến đổi thể hiện sự tương quan theo số mũ với thời gian lưu trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao và có thể được hồi quy đến phương trình (I) sau như được mô tả trong Tài liệu tham khảo 2. Nên lưu ý rằng, do tính kỵ nước của polypeptit hoặc protein cao hơn, tổng các hằng số Rekker được biến đổi của nó trở nên lớn hơn.

Phương trình toán học 1

$$RT = A \ln(1 + B \sum D_j n_{ij}) + C \quad (I)$$

Trong phương trình (I), "RT" là thời gian lưu, " $\sum D_j n_{ij}$ " là tổng các hằng số Rekker được biến đổi, và "A", "B", và "C" là các hằng số. " D_j " là hằng số Rekker được biến đổi của từng axit amin, và " n_{ij} " là số lượng các gốc của từng axit amin.

FIG.16 minh họa hằng số Rekker được biến đổi của từng axit amin (D_j) (Tài liệu tham khảo 2: Tatsuru Sasagawa et al., Prediction of Peptide Retention Times in

Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography during Linear Gradient elution, *Journal of Chromatography* 240 (1982), 329-340). Nên lưu ý rằng, do tính kỵ nước của axit amin cao hơn, hằng số Retention của nó được biến đổi trở nên lớn hơn.

Do đó, đầu tiên, sự tương quan giữa tổng các hằng số Retention được biến đổi và thời gian lưu trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao được tính sử dụng nhiều peptit có trình tự axit amin đã biết là khác nhau.

Peptit thu được bằng cách phân hủy albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA) bằng trypsin và hỗn hợp peptit có bán trên thị trường (MassPREP Peptit Mixture được sản xuất bởi Nihon Waters K.K.) được sử dụng làm peptit. Trình tự axit amin của BSA bị phân hủy bằng trypsin được xác định bằng cách tiến hành đo MS/MS sử dụng thiết bị LC/MS/MS (ABI 3200 Qtrap được sản xuất bởi Applied Biosystems) và phân tích kết quả đo sử dụng phần mềm có bán trên thị trường (Protein Pilot, được sản xuất bởi Applied Biosystems). Phân tích các peptit này bằng sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao được thực hiện theo cách tương tự như cách nêu trong "Sắc ký pha đảo" được mô tả ở trên.

FIG.17 minh họa trình tự axit amin, thời gian lưu (phút) trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao, một phần của số hạng đầu tiên ở phía bên tay phải ($\ln(1+\sum D_{j,n_{ij}})$) của phương trình (I), tổng các hằng số Retention được biến đổi ($\sum D_{j,n_{ij}}$), và gốc của axit amin (BSA bị phân hủy bằng trypsin hoặc MassPREP Peptit Mixture) đối với mỗi peptit trong số nhiều peptit được đưa vào phân tích.

FIG.18 minh họa sự tương quan tuyến tính giữa một phần của số hạng đầu tiên ở phía bên tay phải ($\ln(1+\sum D_{j,n_{ij}})$) của phương trình (I) và thời gian lưu trong sắc ký lỏng pha đảo hiệu năng cao thu được dựa trên kết quả được minh họa trên FIG.17. Cụ thể, sự tương quan cao như được minh họa trên FIG.18 ($R=0,95$) thu được bằng phương pháp hình vuông tối thiểu dựa trên kết quả được minh họa trên FIG.17 khi hằng số B là "1" trong phương trình (I), và các hằng số A và C trong phương trình (I) xác định được lần lượt là "16,60" và "-20,31".

Ngoài ra, tổng các hằng số Retention được biến đổi của polypeptit kỵ nước được rửa giải ở thời gian lưu là 20 phút được tính là "10,3" dựa trên phương trình quan hệ tuyến tính được minh họa trên FIG.18. Cụ thể, polypeptit kỵ nước được rửa giải ở thời gian lưu là 20 phút hoặc nhiều hơn và việc cải thiện các đặc tính bọt được xác định khi

polypeptit có tổng các hằng số Rekker được biến đổi là "10,3" hoặc nhiều hơn. Hơn nữa, tổng các hằng số Rekker được biến đổi là polypeptit kỵ nước được rửa giải ở thời gian lưu là 30 phút được tính là "19,7" dựa trên phương trình quan hệ tuyến tính được mô tả ở trên.

Ví dụ 9

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza. Proteaza P5 được sử dụng trong Ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Ví dụ 9-1

Trong ví dụ 9-1, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza trong bể thứ nhất và việc xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym trong bể thứ hai được thực hiện song song theo biểu đồ được minh họa trên FIG.19A để tạo ra dung dịch lên men sơ bộ. Nên lưu ý rằng, thùng kín được sử dụng làm bể thứ nhất, và bể kín được sử dụng làm bể thứ hai.

Đầu tiên, bổ sung 440kg lúa mạch (52% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch) và 440g proteaza (0,1% trọng lượng lúa mạch) vào nước nóng ở nhiệt độ 65°C trong bể thứ nhất để tạo ra chế phẩm lúa mạch. Sau đó, như được minh họa trên FIG.19A, xử lý lúa mạch bằng proteaza bằng cách giữ chế phẩm lúa mạch ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 phút ("Lúa mạch" được minh họa trên FIG.19A).

Trong khi đó, bổ sung 405kg lúa mạch nảy mầm (48% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch) vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C trong bể thứ hai để tạo ra chế phẩm lúa mạch nảy mầm. Sau đó, như được minh họa trên FIG.19A, tiến hành quá trình đậm hóa, trong đó lúa mạch nảy mầm được xử lý bằng enzym có trong lúa mạch nảy mầm, bằng cách giữ chế phẩm lúa mạch nảy mầm ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút ("Lúa mạch nảy mầm" được minh họa trên FIG.19A).

Sau đó, chế phẩm lúa mạch nảy mầm được chuyển từ bể thứ hai sang bể thứ nhất trong khi gia nhiệt chế phẩm lúa mạch nảy mầm để tăng nhiệt độ của nó đến nhiệt độ 65°C. Cụ thể, chế phẩm lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm được trộn trong bể thứ nhất.

Ngoài ra, tiến hành đường hóa bằng cách giữ hỗn hợp được tạo ra ở nhiệt độ 65°C trong bể thứ nhất. Sau đó, gia nhiệt hỗn hợp và giữ ở nhiệt độ 76°C trong thời gian 1 phút, rồi lọc. Gia nhiệt thêm cho hỗn hợp đến nhiệt độ 100°C, bổ sung 4kg hoa hublông, và đun sôi hỗn hợp. Lọc hỗn hợp sau khi đun sôi và làm mát để thu được dung dịch lên men sơ bộ. Tiếp theo, tiến hành lên men rượu để thu được đồ uống có cồn có ga theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Ví dụ 9-2

Trong Ví dụ 9-2, việc xử lý lúa mạch và lúa mạch nảy mầm bằng proteaza và enzym có trong lúa mạch nảy mầm được thực hiện trong thùng kín theo biểu đồ được minh họa trên FIG.19B để tạo ra dung dịch lên men sơ bộ. Cụ thể, đầu tiên, bổ sung nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông, chứa 440kg lúa mạch (52% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), 405kg lúa mạch nảy mầm (48% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), và 440g proteaza (0,1% trọng lượng lúa mạch), vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C để tạo ra hỗn hợp. Sau đó, như được minh họa trên FIG.19B, xử lý lúa mạch bằng proteaza và tiến hành quá trình đậm hóa bằng cách giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút.

Tiếp theo, thực hiện quá trình đường hóa bằng cách gia nhiệt hỗn hợp và giữ hỗn hợp này ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 20 phút. Sau đó, giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 76°C trong thời gian 1 phút, rồi lọc. Hơn nữa, gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ 100°C, bổ sung 4kg hoa hublông, và đun sôi hỗn hợp. Lọc hỗn hợp sau khi đun sôi và làm mát để thu được dung dịch lên men sơ bộ. Tiếp theo, tiến hành lên men rượu để thu được đồ uống có cồn có ga theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 1 nêu trên.

Đánh giá giá trị NIBEM

Đo giá trị NIBEM của mỗi loại trong số 2 loại đồ uống có cồn có ga thu được như được mô tả ở trên theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 1 nêu trên. Kết quả là, giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-1 cao hơn 21 giây so với giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-2.

Đánh giá cảm quan

Hơn nữa, đánh giá cảm quan đối với mỗi loại trong số 2 loại đồ uống có cồn có ga được tiến hành nhờ 6 chuyên gia. Cụ thể, nhiều thông số về mùi, vị, và các thông số

tương tự của đồ uống có cồn có ga được đánh giá một cách toàn diện và được các chuyên gia cho điểm (việc đánh giá được thực hiện ở ba cấp độ, tức là, A, B, và C, và do đó sau đây được gọi là “đánh giá ABC”). Hơn nữa, tính dễ uống của đồ uống có cồn có ga cũng được đánh giá và cho điểm. Ở đây, đồ uống có cồn có ga, mà sau khi uống cốc thứ nhất lại muốn uống cốc khác, được xác định là đồ uống có cồn có ga dễ uống. Ngoài ra, điểm số cao được cho đối với đồ uống có cồn có ga có tính dễ uống cao.

FIG.20 minh họa kết quả đánh giá cảm quan. Trên FIG.20, trục nằm ngang biểu thị cho loại đồ uống có cồn có ga (đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-1 được biểu thị bởi "9-1," và đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-2 được biểu thị bởi "9-2"), và trục thẳng đứng là điểm số thu được từ mỗi đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống. Hơn nữa, kết quả đánh giá ABC được biểu thị bởi cột tô đậm, và kết quả đánh giá tính dễ uống được biểu thị bởi cột rỗng.

Như được minh họa trên FIG.20, đạt được điểm số cao trong đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống ở cả hai đồ uống có cồn có ga. Hơn nữa, điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-1 là cao hơn rất nhiều so với điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-2 trong cả đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống.

Hơn nữa, hàm lượng các thành phần hương vị trong mỗi đồ uống có cồn có ga được đo. Kết quả là, hàm lượng rượu isoamylic trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-2 là cao hơn so với hàm lượng rượu isoamylic trong đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 9-1. Rượu isoamylic là thành phần gây ra ảnh hưởng không có lợi đối với hương vị của đồ uống có cồn có ga khi hàm lượng của nó quá cao. Do đó, có thể hiểu được là, một trong các lý do để có đánh giá cao trong đánh giá cảm quan là ngăn chặn được một cách hiệu quả việc tăng hàm lượng rượu isoamylic trong đồ uống có cồn có ga trong ví dụ 9-1.

Như được mô tả ở trên, đồ uống có cồn có ga có cả các đặc tính bọt tuyệt vời và các đặc tính hương vị tuyệt vời ở mức đặc biệt cao có thể được sản xuất bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza trong bể thứ nhất và xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym trong bể thứ hai.

Ví dụ 10

Đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng phương pháp ngâm chiết, sử dụng nguyên liệu thô chứa nguyên liệu thô lúa mạch bao gồm lúa mạch và lúa mạch nảy mầm, hoa hublông, và proteaza. Proteaza P5 được sử dụng trong ví dụ 1 nêu trên được sử dụng làm proteaza.

Ví dụ 10-1 (65)

Trong ví dụ 10-1 (65), đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 9-1 nêu trên, ngoại trừ là tỉ lệ giữa lúa mạch và lúa mạch nảy mầm trong nguyên liệu thô lúa mạch là khác.

Cụ thể hơn, đầu tiên, bổ sung 830g lúa mạch (77% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch) và 1,08g proteaza (0,13% trọng lượng lúa mạch) vào nước nóng ở nhiệt độ 65°C trong bể thứ nhất để tạo ra chế phẩm lúa mạch. Sau đó, như được minh họa trên FIG.19A, xử lý lúa mạch bằng proteaza bằng cách giữ chế phẩm lúa mạch này ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 45 phút.

Trong khi đó, bổ sung 250g lúa mạch nảy mầm (23% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch) vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C trong bể thứ hai để tạo ra chế phẩm lúa mạch nảy mầm. Sau đó, như được minh họa trên FIG.19A, tiến hành quá trình đậm hóa trong đó lúa mạch nảy mầm được xử lý bằng enzym có trong lúa mạch nảy mầm bằng cách giữ chế phẩm lúa mạch nảy mầm ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút.

Tiếp theo, tiến hành bước trộn chế phẩm lúa mạch và chế phẩm lúa mạch nảy mầm, bước đường hóa hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt, bước bổ sung hoa hublông vào hỗn hợp, và đun sôi theo cách tương tự như cách nêu trong Ví dụ 9-1 nêu trên để tạo ra dung dịch lên men sơ bộ. Sau đó, thực hiện quá trình lên men rượu để thu được đồ uống có cồn có ga.

Ví dụ 10-1 (50)

Trong ví dụ 10-1 (50), đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 10-1 (65) nêu trên, ngoại trừ là nhiệt độ cho việc xử lý lúa mạch bằng proteaza được thay đổi thành 50°C.

Ví dụ 10-2 (50)

Trong ví dụ 10-2 (50), đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 9-2 nêu trên, ngoại trừ là các tỉ lệ của lúa mạch và lúa mạch nảy mầm là khác nhau trong nguyên liệu thô lúa mạch.

Cụ thể hơn, đầu tiên, cho nguyên liệu thô ngoại trừ hoa hublông, chứa 830g lúa mạch (77% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), 250kg lúa mạch nảy mầm (23% trọng lượng nguyên liệu thô lúa mạch), và 1,08g proteaza (0,13% trọng lượng lúa mạch), vào nước nóng ở nhiệt độ 50°C để tạo ra hỗn hợp. Sau đó, xử lý lúa mạch bằng proteaza, và tiến hành quá trình đậm hóa bằng cách giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút, như được minh họa trên FIG.19B.

Tiếp theo, tiến hành quá trình đường hóa hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt, bổ sung hoa hublông vào hỗn hợp, và đun sôi theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 9-2 nêu trên để tạo ra dung dịch lên men sơ bộ. Sau đó, thực hiện quá trình lên men rượu để thu được đồ uống có cồn có ga.

Ví dụ 10-2 (65)

Trong ví dụ 10-2 (65), đồ uống có cồn có ga được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 10-2 (50) nêu trên, ngoại trừ là lúa mạch và lúa mạch nảy mầm lần lượt được xử lý bằng proteaza và enzym có trong lúa mạch nảy mầm, ở nhiệt độ 65°C.

Ví dụ so sánh

Hơn nữa, đồ uống có cồn có ga làm đối chứng so sánh được sản xuất theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 10-2 (50) nêu trên, ngoại trừ là không sử dụng proteaza.

Đánh giá giá trị NIBEM

Đánh giá các giá trị NIBEM của 5 loại đồ uống có cồn có ga, được sản xuất theo cách đó, theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 1 nêu trên. FIG.21 minh họa kết quả đo các giá trị NIBEM. Trục nằm ngang biểu thị cho loại đồ uống có cồn có ga (đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ so sánh được biểu thị bởi "C"), và trục thẳng đứng là giá trị NIBEM (giây) trên FIG.21.

Như được minh họa trên FIG.21, các giá trị NIBEM của tất cả đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza lớn hơn rõ

rệt so với giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza trong ví dụ so sánh.

Hơn nữa, giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-2 (50) giảm so với giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-2 (65). Mặt khác, giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-1 (50) là tương đương với hoặc cao hơn so với giá trị NIBEM của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-1 (65).

Cụ thể hơn, thu được các giá trị NIBEM cao rõ rệt, bất kể nhiệt độ cho việc xử lý bằng proteaza trong ví dụ 10-1 (50) và ví dụ 10-1 (65), trong mỗi ví dụ này, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym được thực hiện trong các bể khác nhau.

Đánh giá cảm quan

Đánh giá cảm quan (đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống) đối với 5 loại đồ uống có cồn có ga được thực hiện bởi 6 chuyên gia theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 9 nêu trên.

FIG.22 minh họa kết quả đánh giá cảm quan. Trục nằm ngang biểu thị cho loại đồ uống có cồn có ga và trục thẳng đứng là điểm số thu được trong mỗi đánh giá trong số các đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống trên FIG.22. Kết quả đánh giá ABC được biểu thị bởi cột tô đen, và kết quả đánh giá tính dễ uống được biểu thị bởi cột rỗng.

Như được minh họa trên FIG.22, thu được điểm số cao rõ rệt trong tất cả các đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch được xử lý bằng proteaza so với điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất bằng cách sử dụng lúa mạch không được xử lý bằng proteaza trong ví dụ so sánh, trong cả đánh giá ABC và đánh giá tính dễ uống.

Hơn nữa, điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-2 (65) là thấp hơn so với điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-2 (50). Mặt khác, điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-1 (65) là tương đương với điểm số của đồ uống có cồn có ga được sản xuất trong ví dụ 10-1 (50).

Cụ thể hơn, thu được điểm số cao rõ rệt bất kể nhiệt độ cho việc xử lý bằng proteaza trong ví dụ 10-1 (50) và ví dụ 10-1 (65), trong từng trường hợp, việc xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm với enzym được thực hiện trong các bể khác nhau.

Như được mô tả nêu trên, đồ uống có cồn có ga, có các đặc tính bọt tuyệt vời và các đặc tính hương vị tuyệt vời ở mức độ cao, có thể được sản xuất một cách chắc chắn, bất kể nhiệt độ cho việc xử lý bằng proteaza, bằng cách tiến hành xử lý lúa mạch bằng proteaza và việc xử lý lúa mạch nảy mầm bằng enzym trong các bể khác nhau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc nhiều hơn,
trong đó polypeptit kỵ nước này thu được bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza,
trong đó polypeptit kỵ nước bao gồm polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong
khoảng từ 10kDa đến 25kDa, và
trong đó polypeptit kỵ nước có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn.
2. Đồ uống có ga theo điểm 1, trong đó polypeptit kỵ nước có tổng các hằng số Rekker
được biến đổi là 10,3 hoặc lớn hơn.
3. Đồ uống có ga theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polypeptit kỵ nước bao gồm polypeptit
có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,4.
4. Đồ uống có ga theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó polypeptit kỵ
nước chứa polypeptit được bao gồm trong chất lỏng amoni sulfat bão hòa từ 0 đến
40%.
5. Đồ uống có ga theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó trị số
NIBEM của đồ uống có ga là 300 giây hoặc lớn hơn.
6. Phương pháp sản xuất đồ uống có ga bao gồm các bước:
sử dụng chất cải thiện đặc tính bột chứa polypeptit kỵ nước làm thành phần hoạt
tính để tạo ra đồ uống có ga chứa polypeptit kỵ nước với lượng 1,1g/lít hoặc nhiều
hơn,
trong đó polypeptit kỵ nước này thu được bằng cách xử lý lúa mạch bằng proteaza,
trong đó polypeptit kỵ nước bao gồm polypeptit có trọng lượng phân tử nằm trong
khoảng từ 10kDa đến 25kDa, và
trong đó polypeptit kỵ nước có hàm lượng prolin là 13,5% mol hoặc lớn hơn.

FIG.1

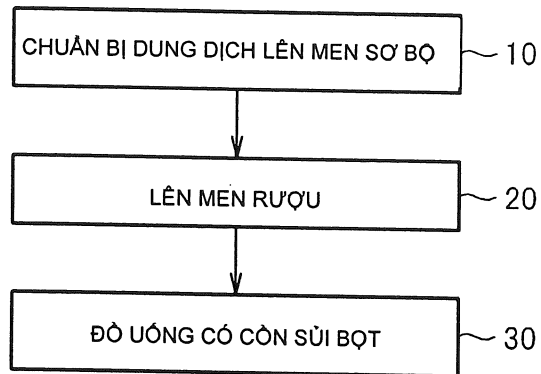


FIG.2A

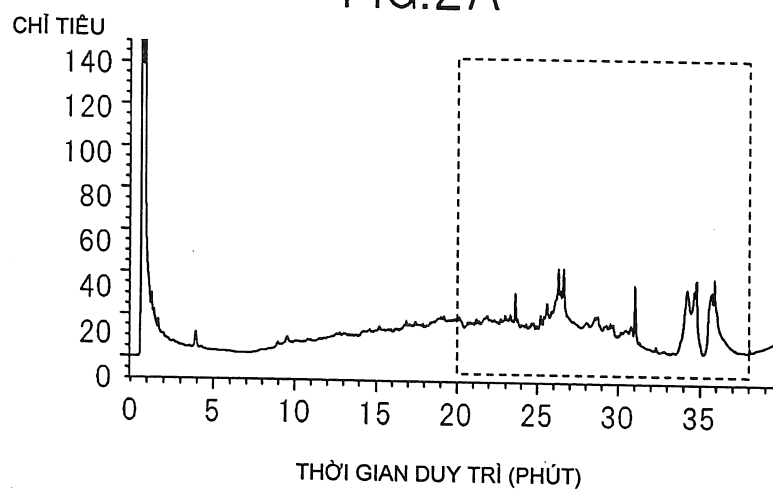


FIG.2B

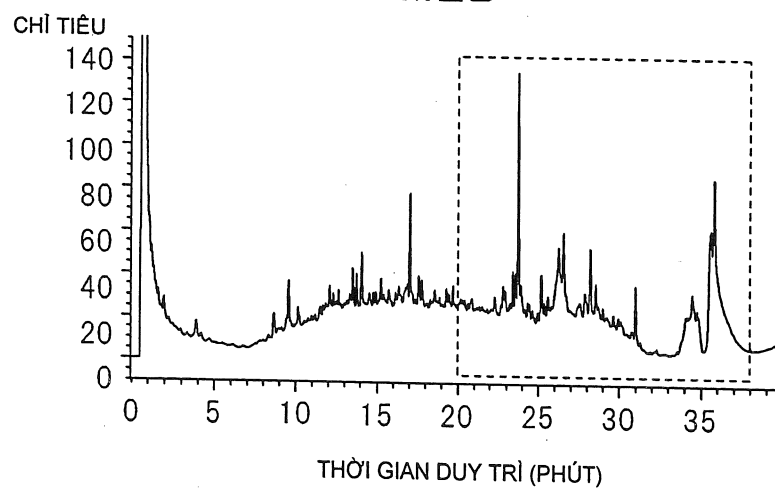


FIG.2C

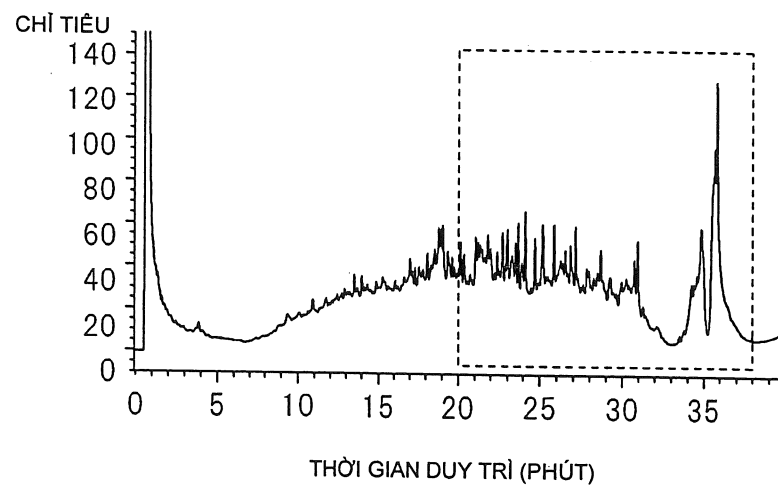


FIG.2D

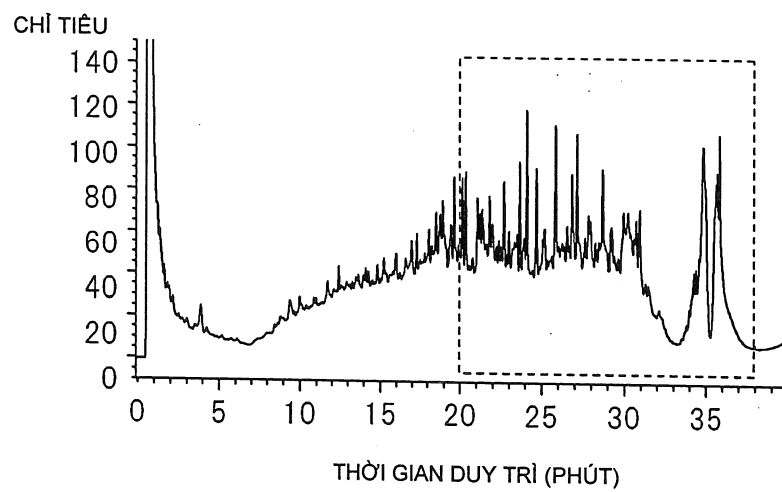


FIG.3

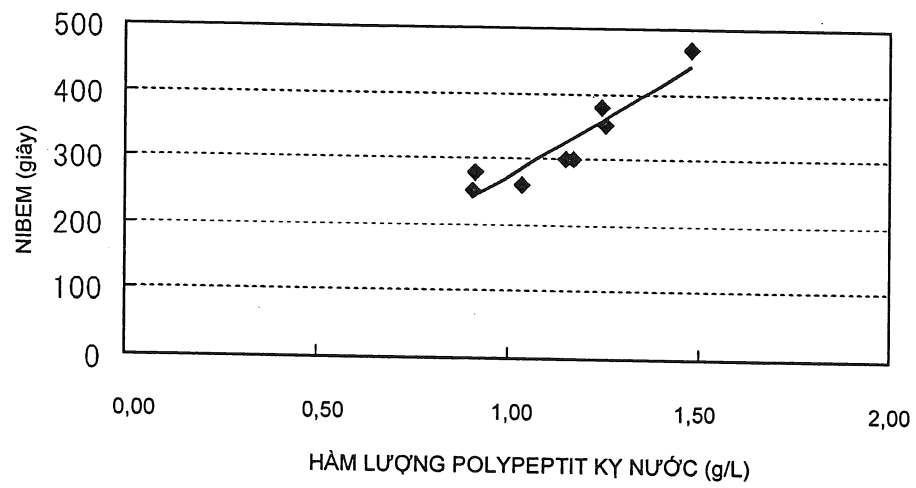


FIG.4

PROTEAZA	HÀM LƯỢNG POLYPEPTIT KỶ NƯỚC (g/L)	SẢN LƯỢNG POLYPEPTIT KỶ NƯỚC (g/kg LÚA MẠCH)	LƯỢNG POLYPEPTIT KỶ NƯỚC TĂNG THÊM		HÀM LƯỢNG PROTEIN 40 kDa (mg/L)	NIBEM (GIẤY)
			(g/L)	(g/kg LÚA MẠCH)		
-	1,04	6,27	-	-	136	262
P1	0,91	5,48	(-0,13)	(-0,78)	259	252
P2	0,91	5,48	(-0,13)	(-0,78)	233	278
P3	1,15	6,93	0,11	0,66	253	302
P4	1,17	7,05	0,13	0,78	179	301
P5	1,24	7,47	0,20	1,20	266	380
P6	1,26	7,59	0,22	1,33	259	354
P7	1,48	8,92	0,44	2,65	259	468

FIG.5

	CHẾ PHẨM AXIT AMIN (% MOL)						
PROTEAZA	—	P1	P4	P5	P6	P7	
Axit aspartic	9,58	8,00	7,63	5,66	5,16	4,47	
Threonin	4,83	3,49	4,45	3,51	2,54	2,86	
Serin	7,30	5,52	6,28	5,46	4,36	4,70	
Axit glutamic	16,88	22,66	21,43	26,91	29,72	30,53	
Glyxin	9,92	7,14	9,68	6,72	4,93	5,20	
Alanin	6,43	4,88	5,39	3,79	3,51	3,04	
Valin	6,15	5,09	5,29	4,56	3,78	4,06	
Xystin	2,80	2,66	2,35	1,92	1,69	1,73	
Methionin	1,71	1,20	1,05	1,05	0,84	0,82	
Isoleuxin	4,28	3,99	3,71	3,84	3,82	3,67	
Leuxin	6,38	5,88	6,26	6,00	4,58	5,39	
Tyrosin	3,13	2,98	3,47	2,92	3,01	2,88	
Phenylalanin	1,70	3,11	2,06	3,70	4,10	4,51	
Lysin	3,08	2,31	1,94	1,62	1,58	1,29	
Histidin	1,77	1,43	1,51	1,39	1,00	1,16	
Arginin	4,06	3,48	2,91	2,54	2,33	2,02	
Prolin	10,02	16,18	14,60	18,40	23,04	21,65	
HÀM LƯỢNG POLYPEPTIT KỶ NƯỚC (g/L)	1,04	0,91	1,17	1,24	1,26	1,48	
NIBEM (GIẤY)	262	252	301	380	354	468	

FIG.6A

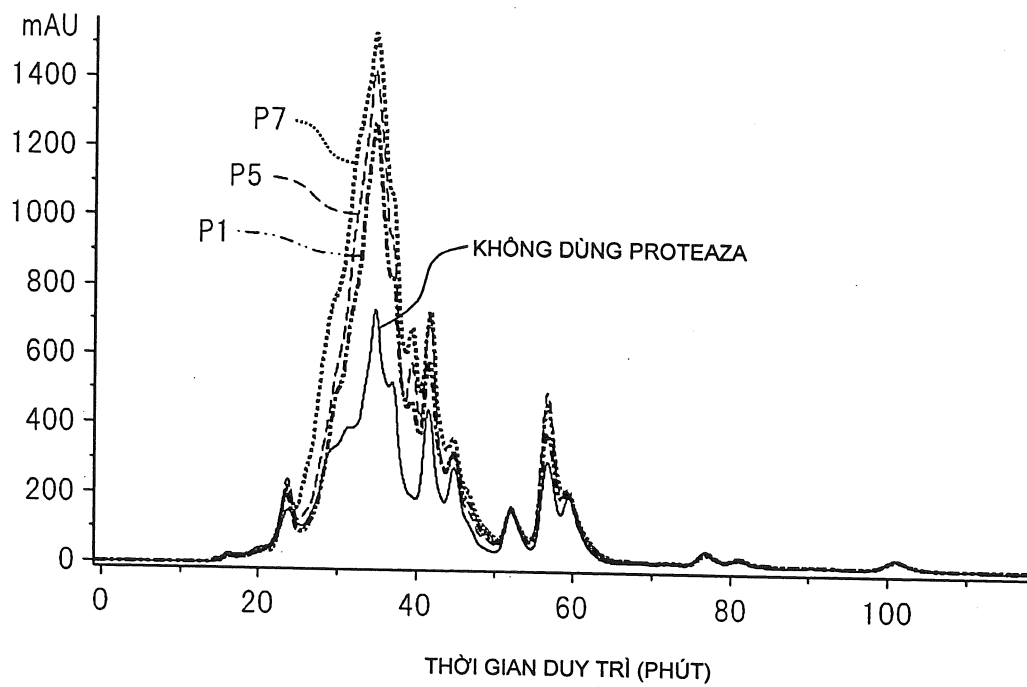


FIG.6B

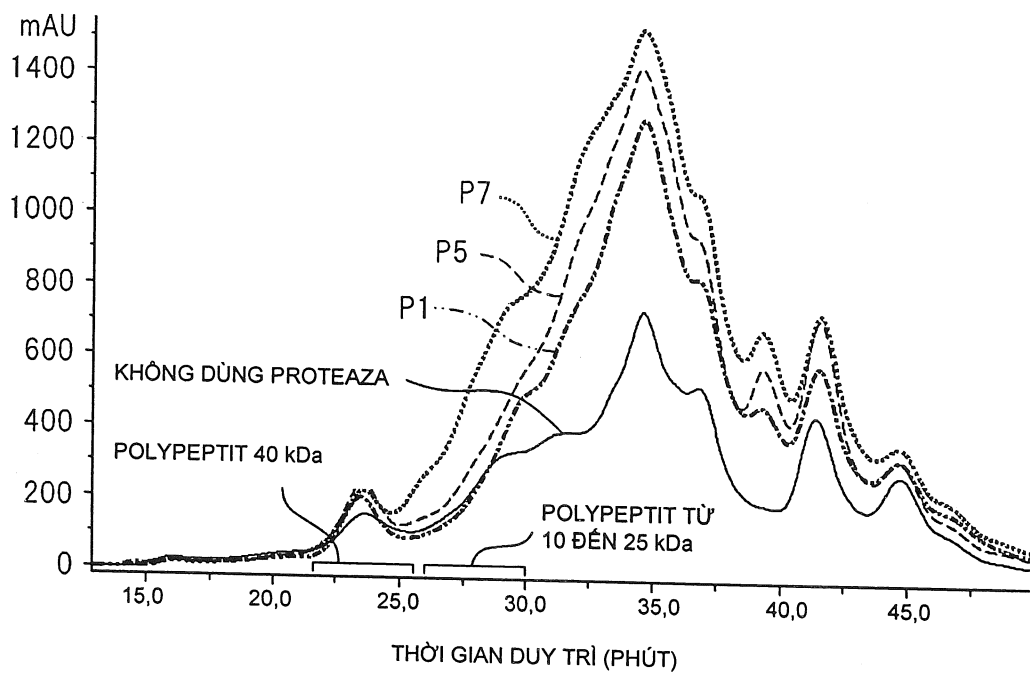


FIG.7A

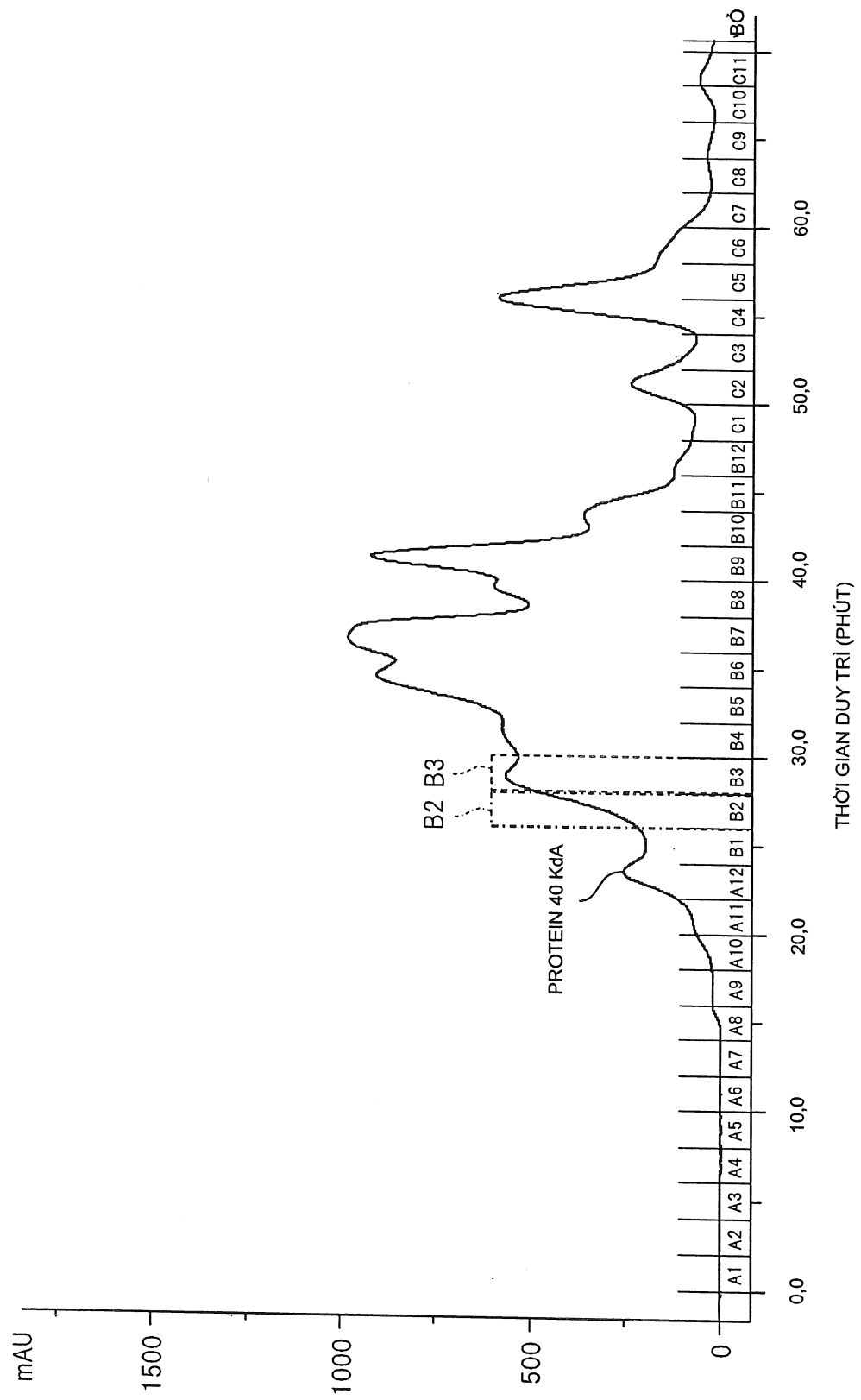


FIG.7B

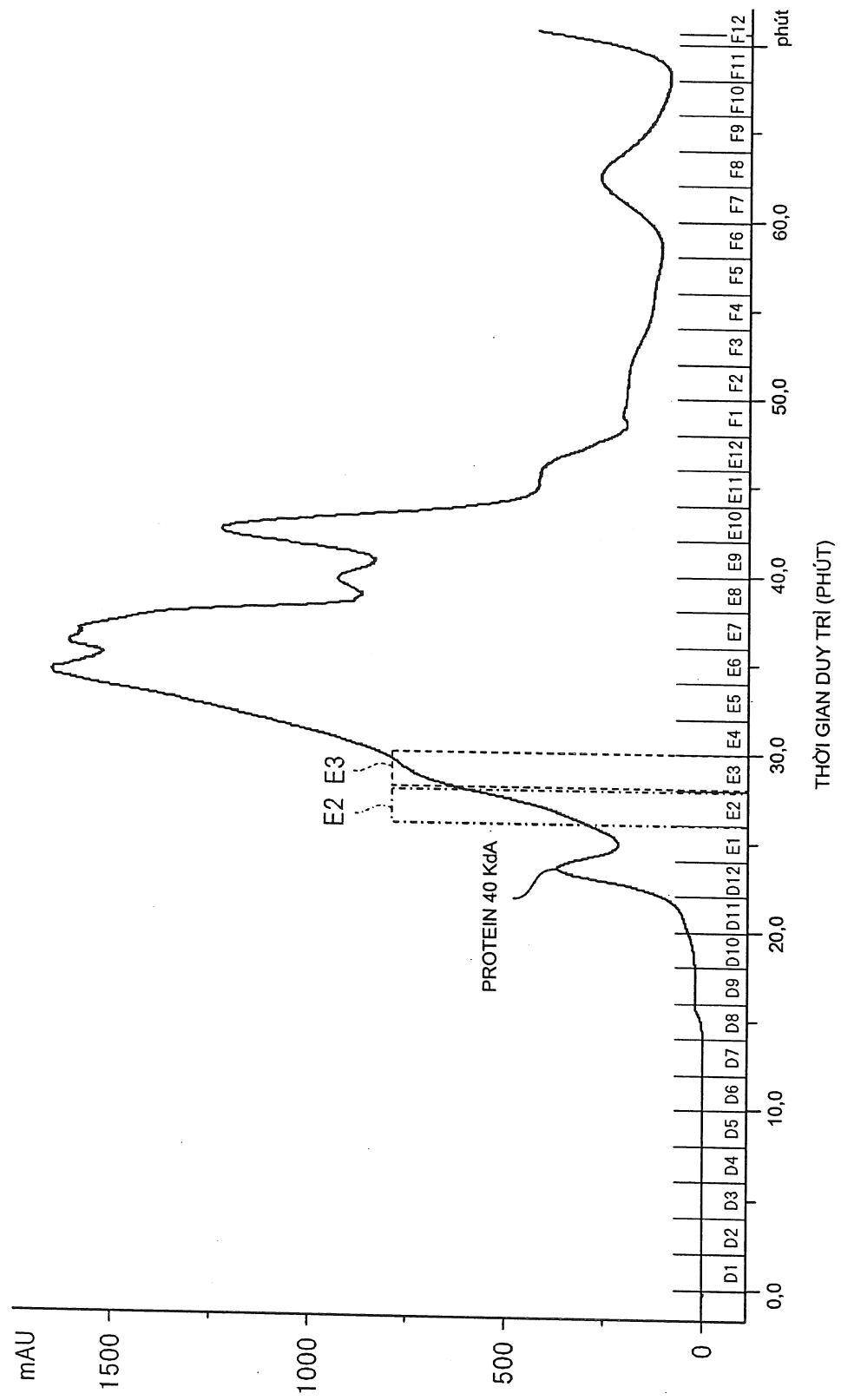


FIG.8A

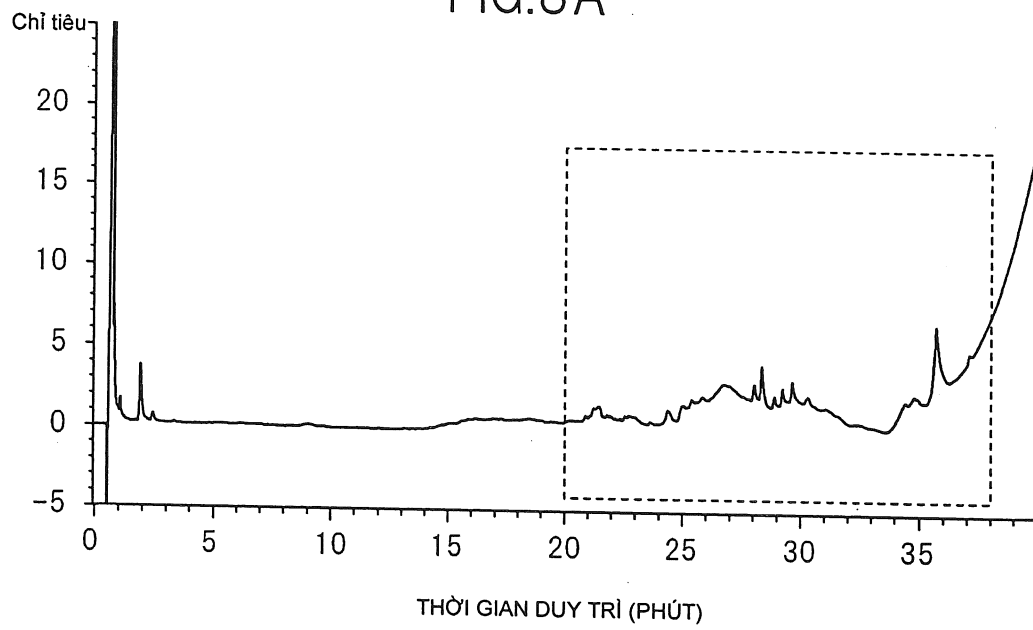


FIG.8B

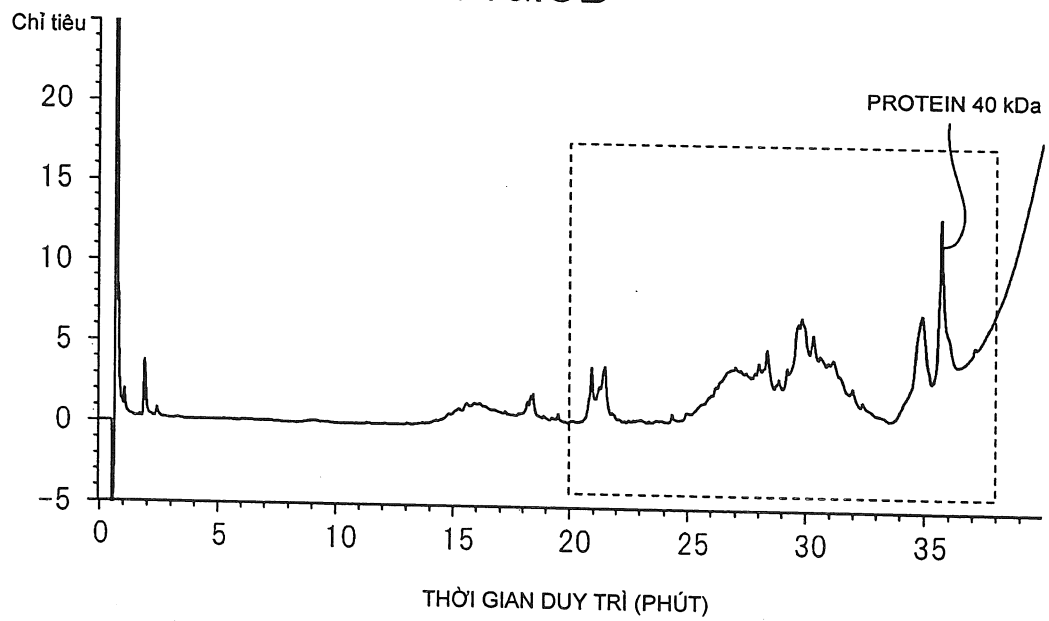


FIG.9A

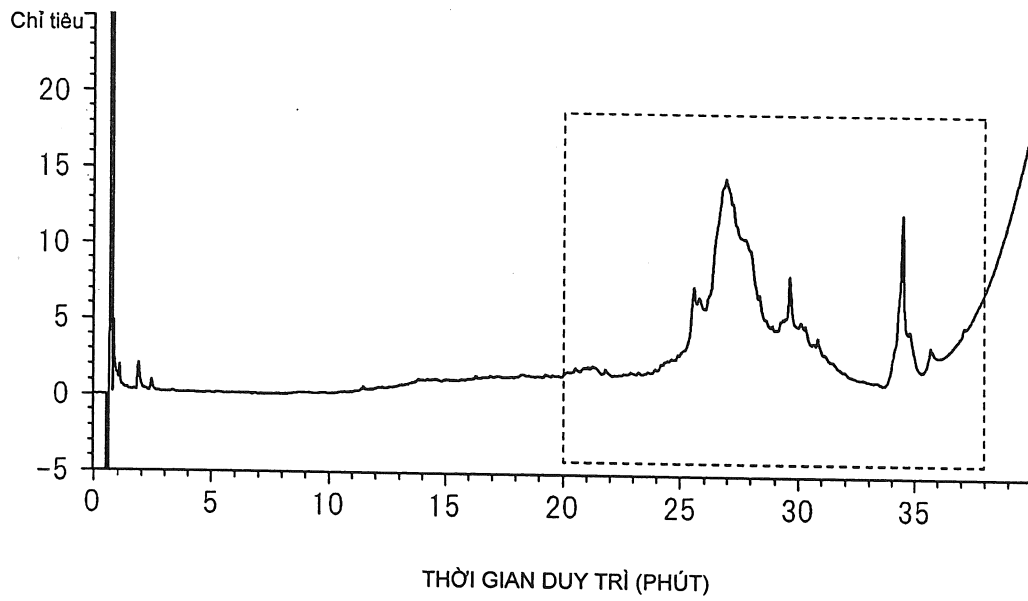


FIG.9B

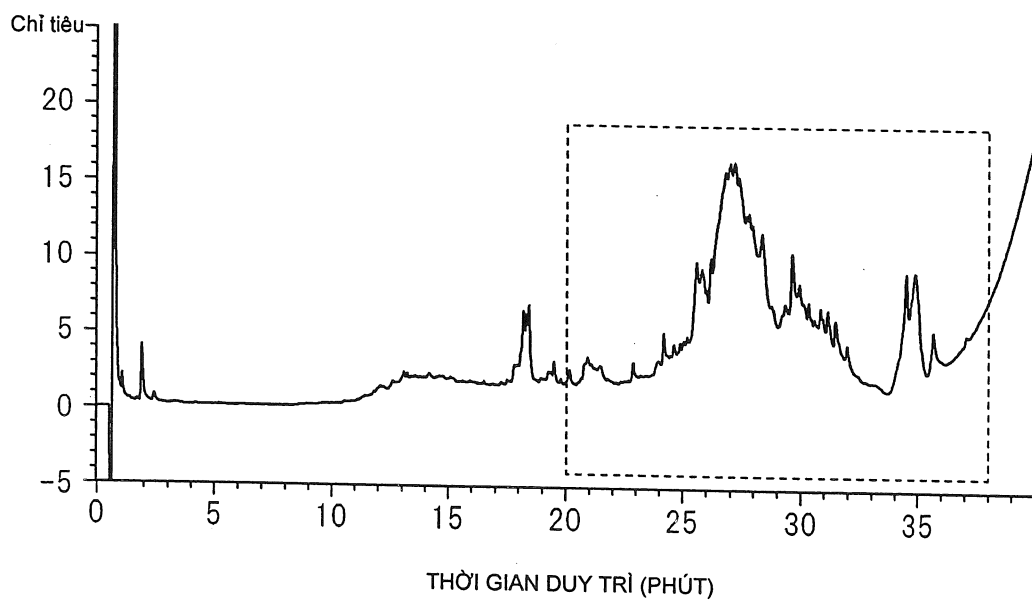


FIG.10A

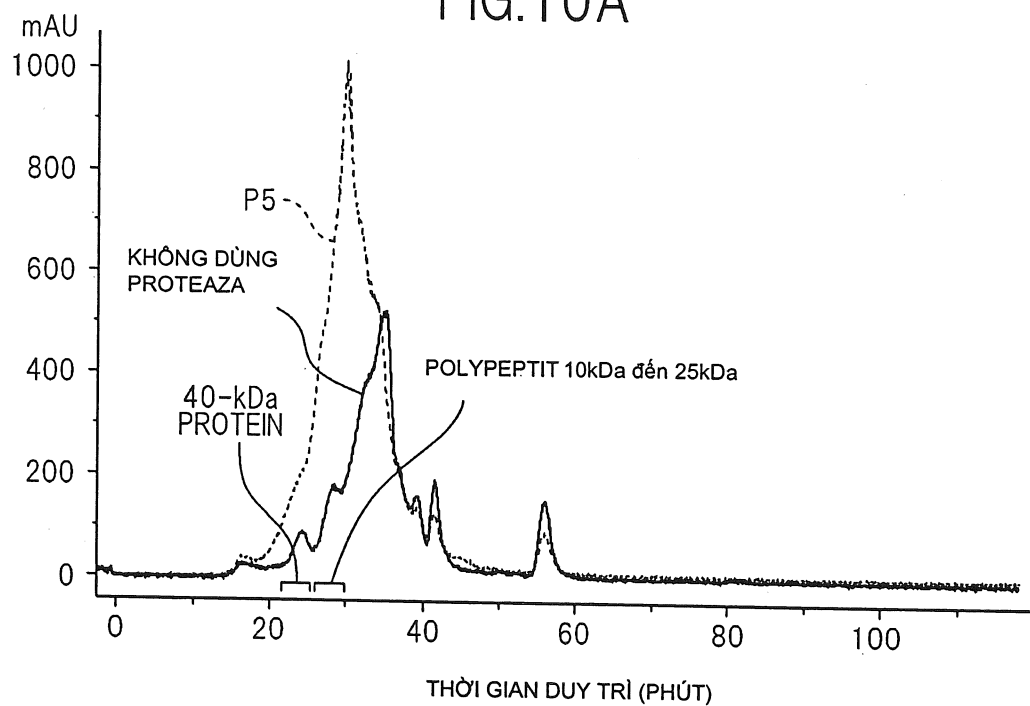
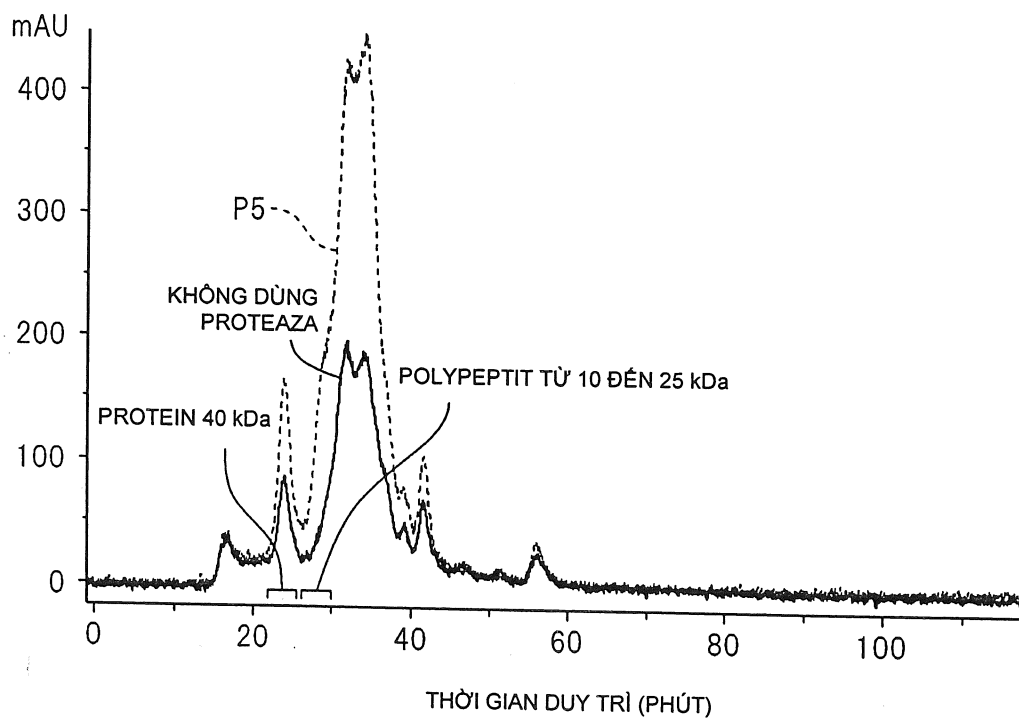


FIG.10B



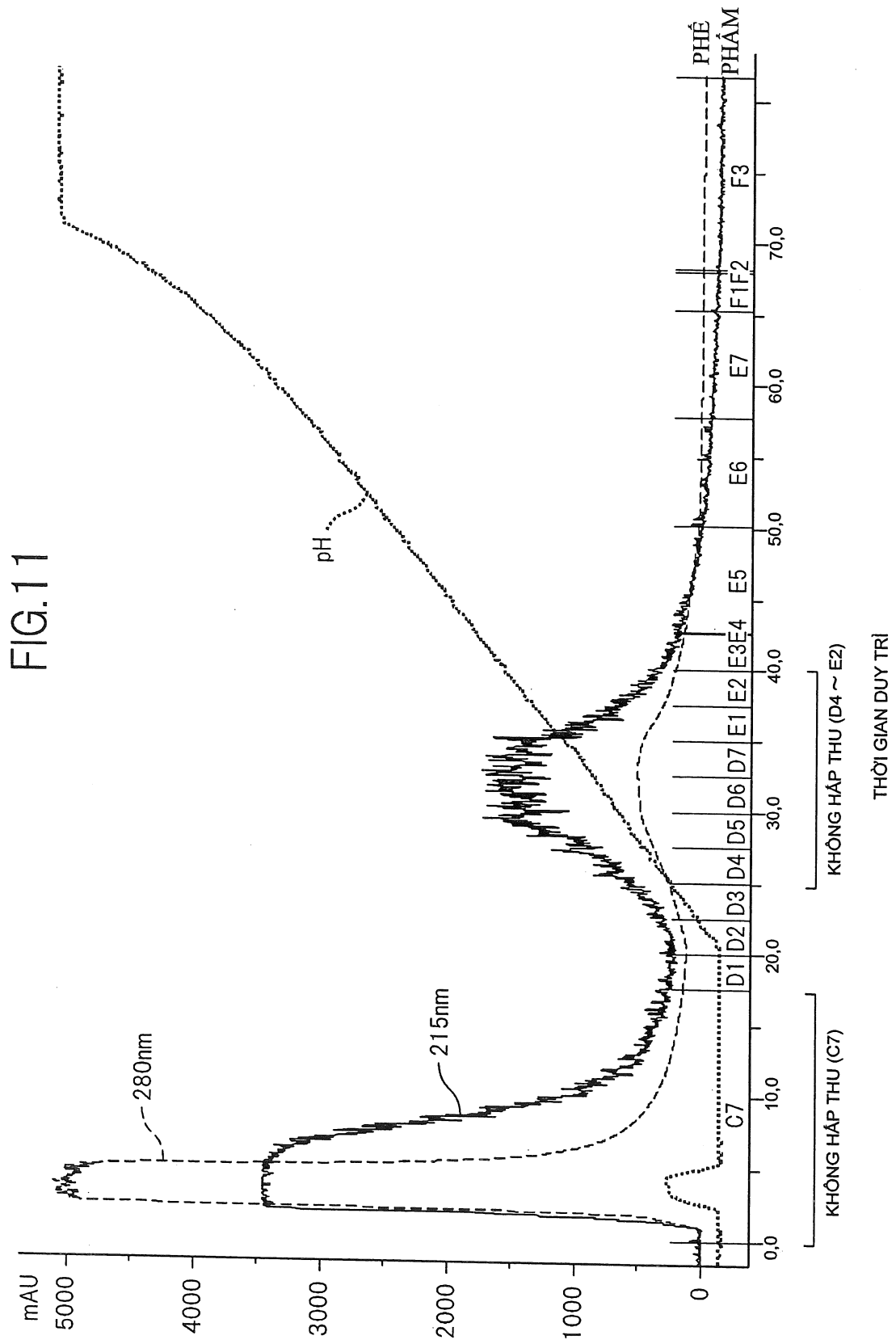


FIG.12

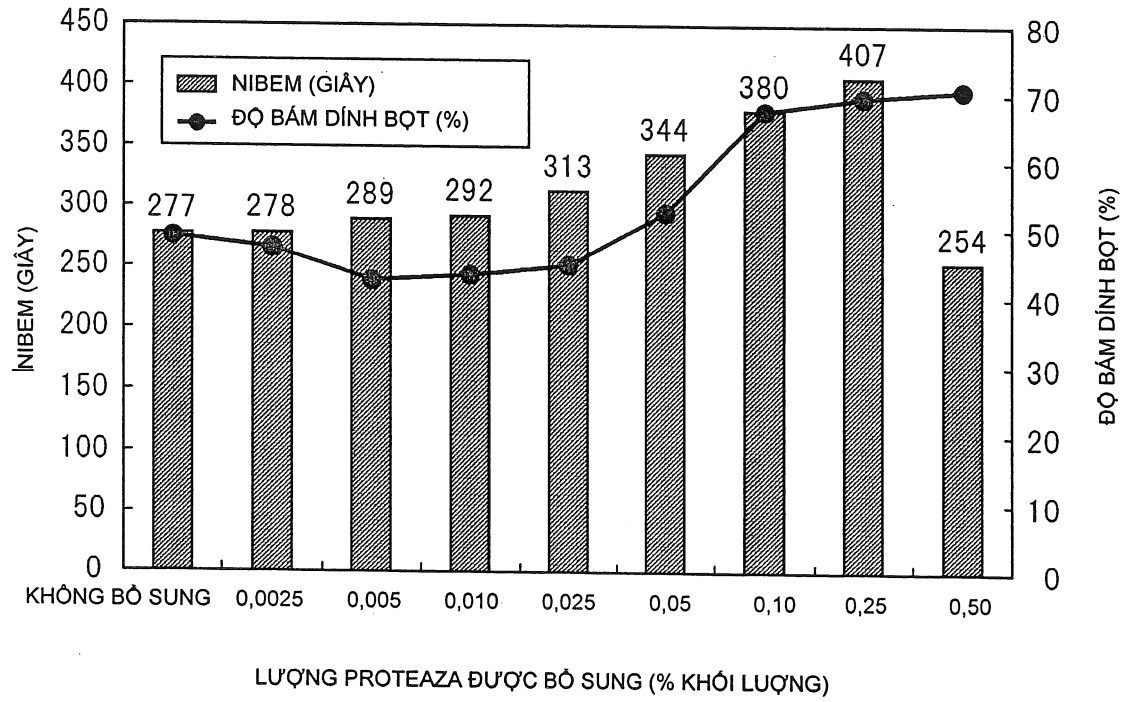


FIG.13

LƯỢNG PROTEAZA ĐƯỢC BỔ SUNG (%KHỐI LƯỢNG)	HÀM LƯỢNG POLYPEPTIT KY NƯỚC (g/L)	NIBEM (GIẤY)
0	0,87	277
0,05	1,14	344
0,25	1,37	407

FIG.14

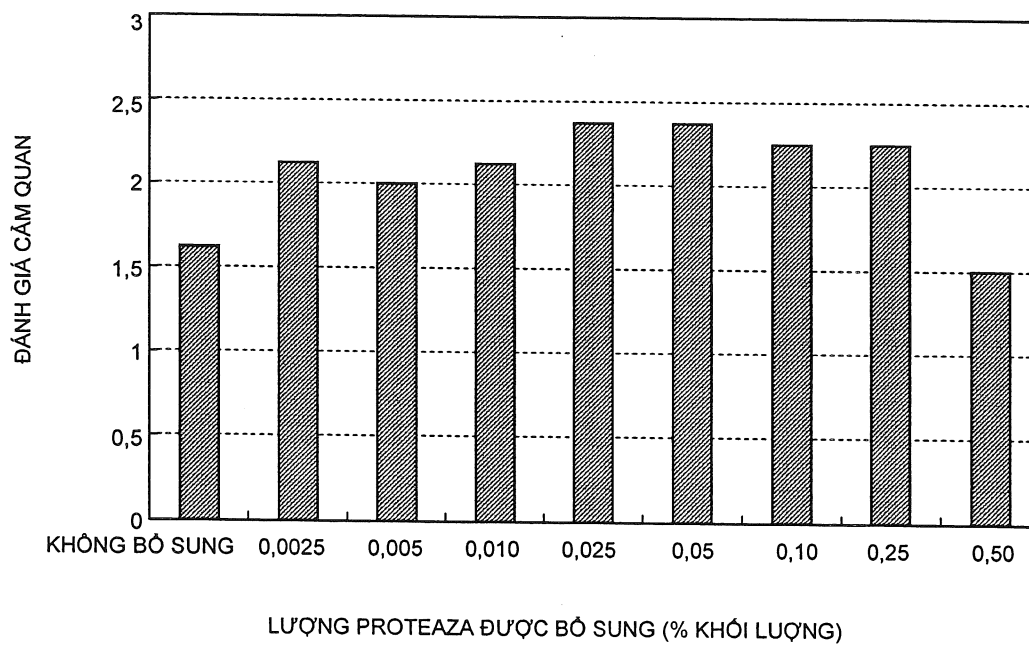
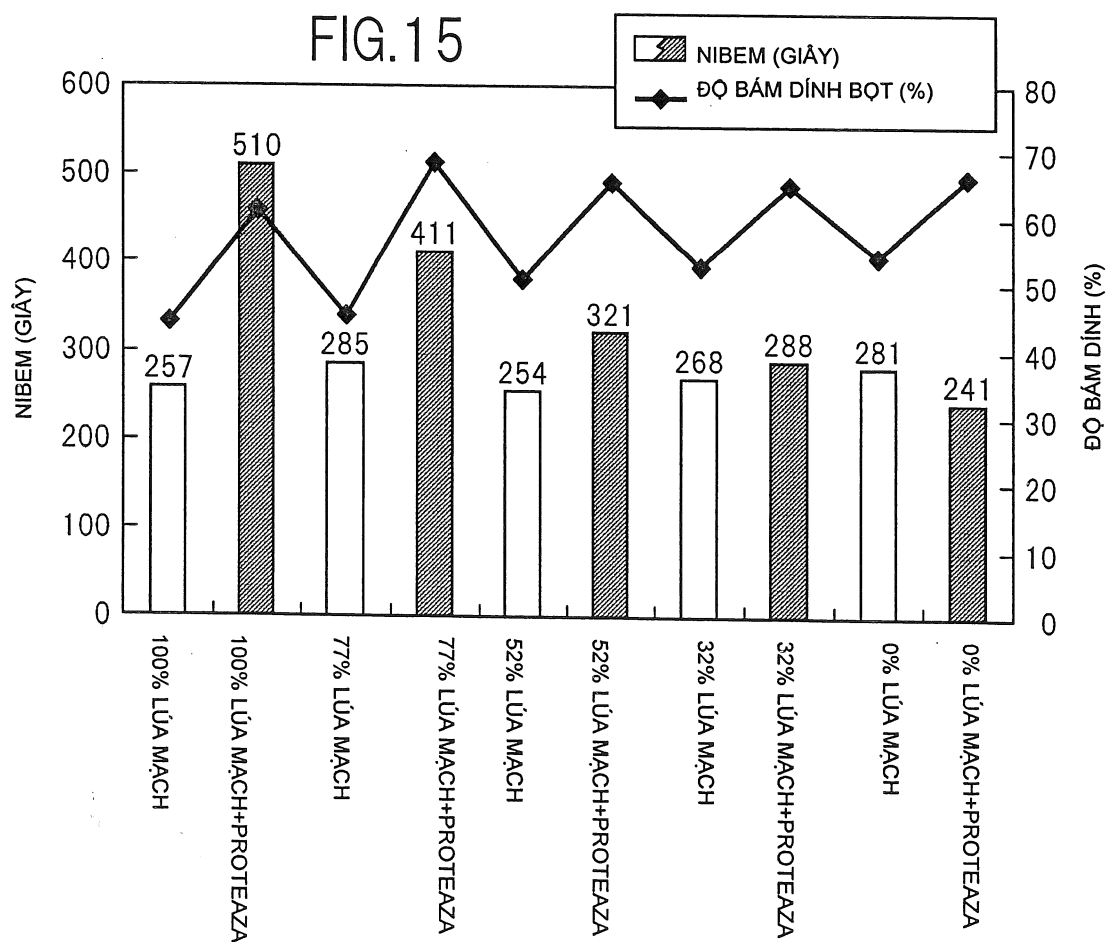


FIG.15



AXIT AMIN	D _j
Tryptophan	2,31
Phenylalanin	2,24
Isoleuxin	1,99
Leuxin	1,99
Tyrosin	1,70
Methionin	1,08
Prolin	1,01
Valin	1,46
Threonin	0,10
Histidin	-0,10
Alanin	0,53
Glutamin	0,20
Axit glutamic	0,20
Glyxin	0,10
Serin	0,10
Arginin	-0,10
Axit aspartic	0,10
Asparagin	0,10
Lysin	-0,10
Carboxymetylxystein	0,10
Homoserin	0,10
Aminoetylxystein	-0,10
Trimetylysin	-0,10
Axetyl-	0,00
Amit-	0,00

FIG.17

TRÌNH TỰ AXIT AMIN	THỜI GIAN DUY TRÌ (PHÚT)	$\ln(1+\sum D_{jnij})_j$	$\sum D_{jnij}$	MẪU
AEFVEVTK	10,314	1,96	6,09	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
TVMENFVAFVDK	21,979	2,47	10,87	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
LVNELTEFAK	16,822	2,27	8,71	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
FKDLGEEHFK	11,973	2,05	6,77	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
DAFLGSFLYEYSR	23,155	2,63	12,89	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
LGEYGFQNALIVR	20,115	2,60	12,50	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
HLVDEPQNLIK	15,435	2,29	8,84	BSA PHÂN HỦY BỞI TRYPSIN
DRVYIHP	13,97	1,95	6,06	Hỗn hợp MassPREP Peptit
RPPGFSPFR	15,26	2,14	7,51	Hỗn hợp MassPREP Peptit
DRVYIHPF	19,31	2,23	8,30	Hỗn hợp MassPREP Peptit
DRVYIHPFHL	23,48	2,42	10,19	Hỗn hợp MassPREP Peptit
DRVYIHPFHLVYS	25,03	2,80	15,44	Hỗn hợp MassPREP Peptit
WLTGPQLADLYHSLMK	27,16	2,77	14,99	Hỗn hợp MassPREP Peptit
YPIVSIEDPFAEDDWEA WSHFFK	31,90	3,16	22,46	Hỗn hợp MassPREP Peptit

FIG.18

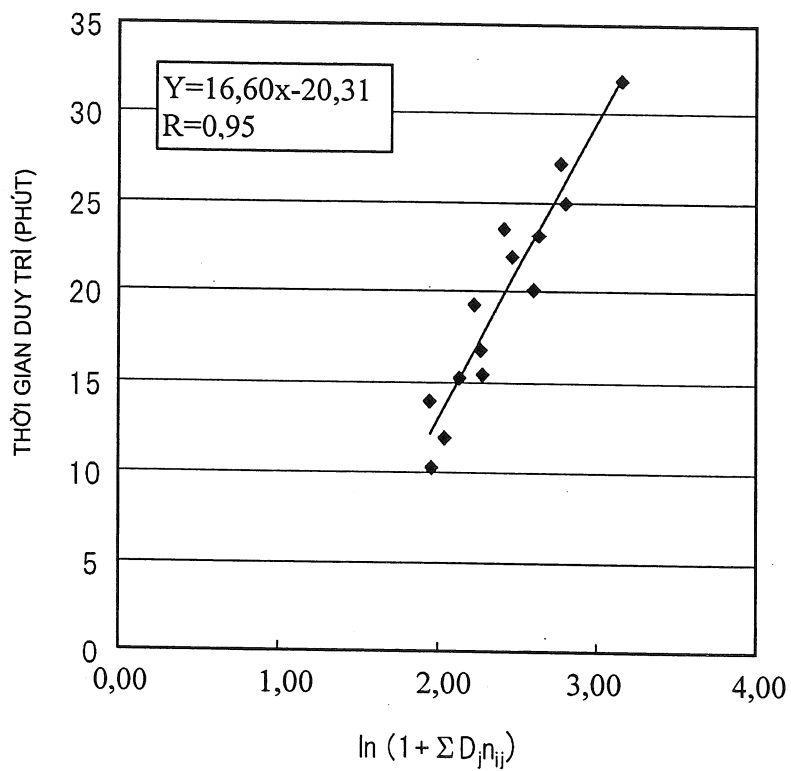


FIG.19A

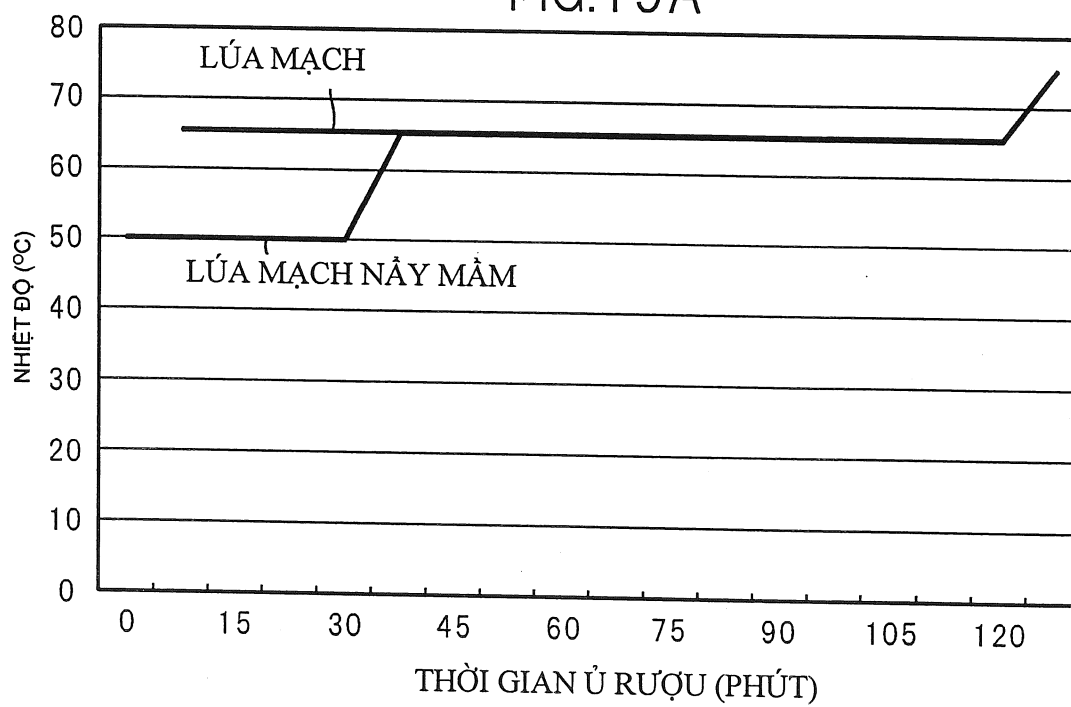


FIG.19B

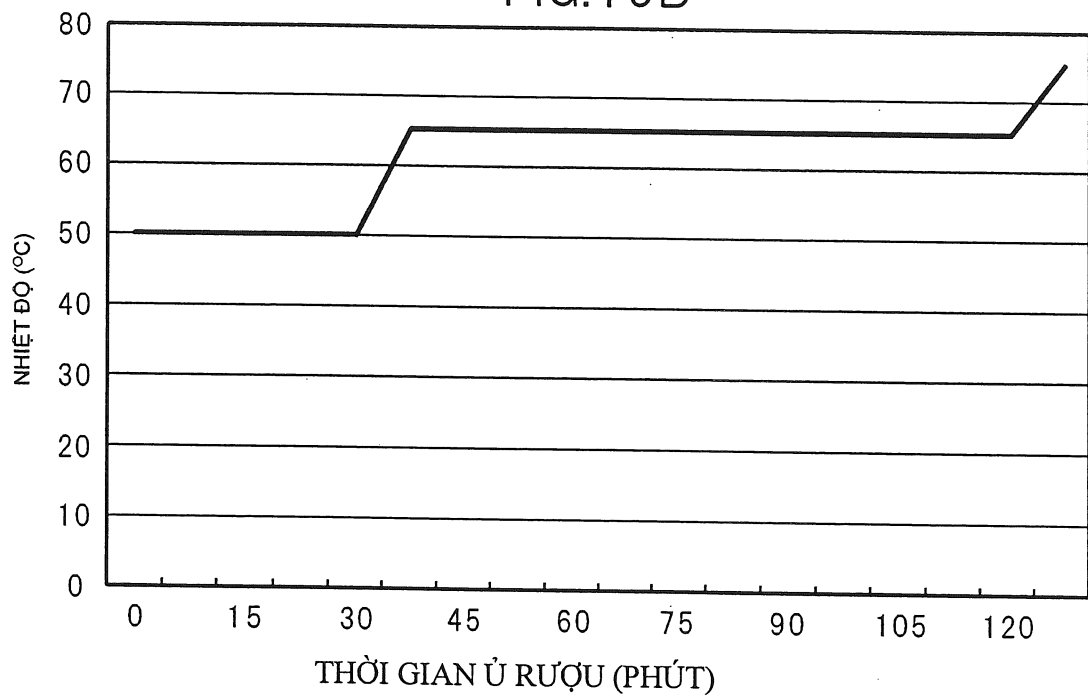


FIG.20

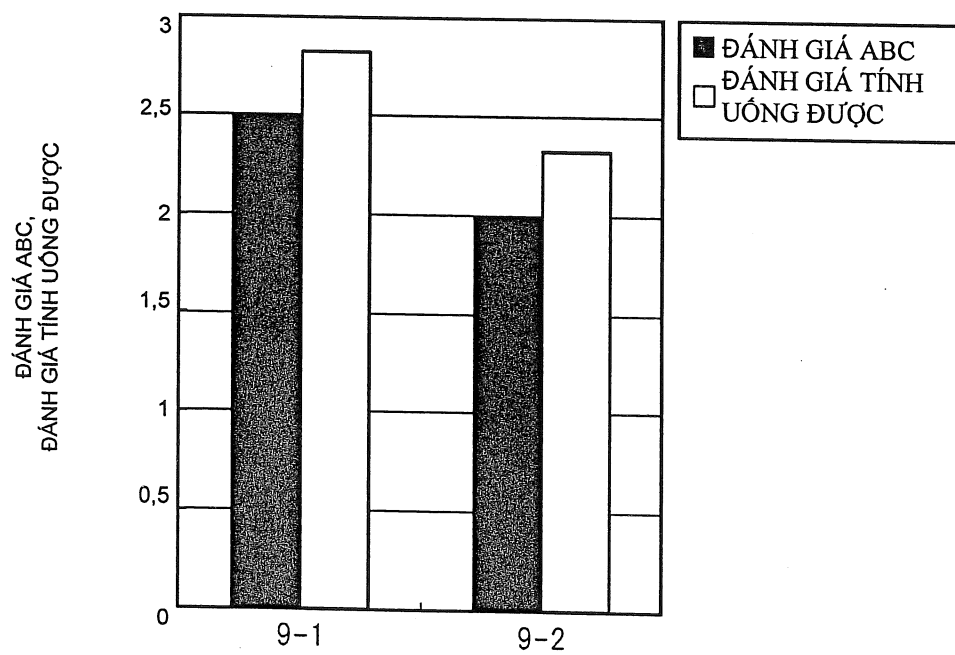


FIG.21

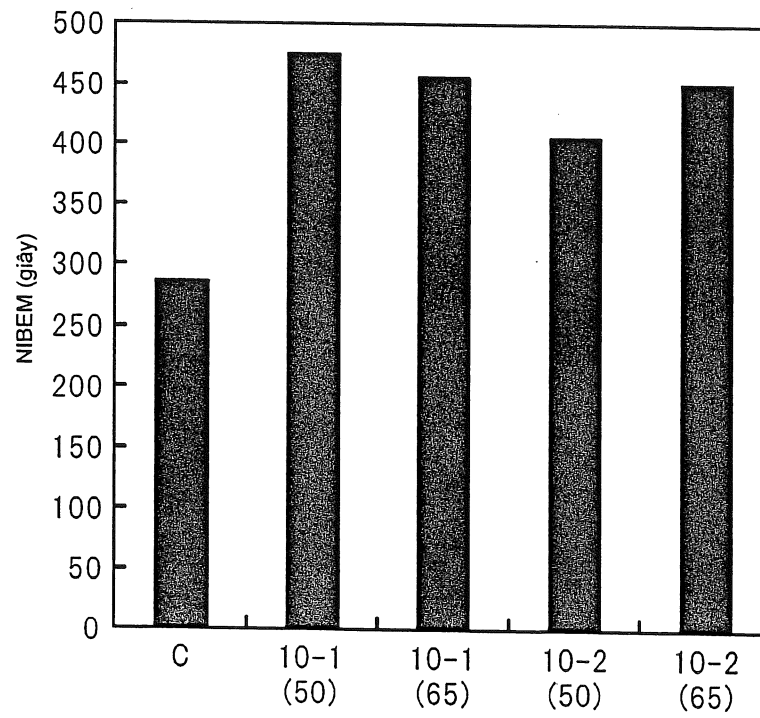
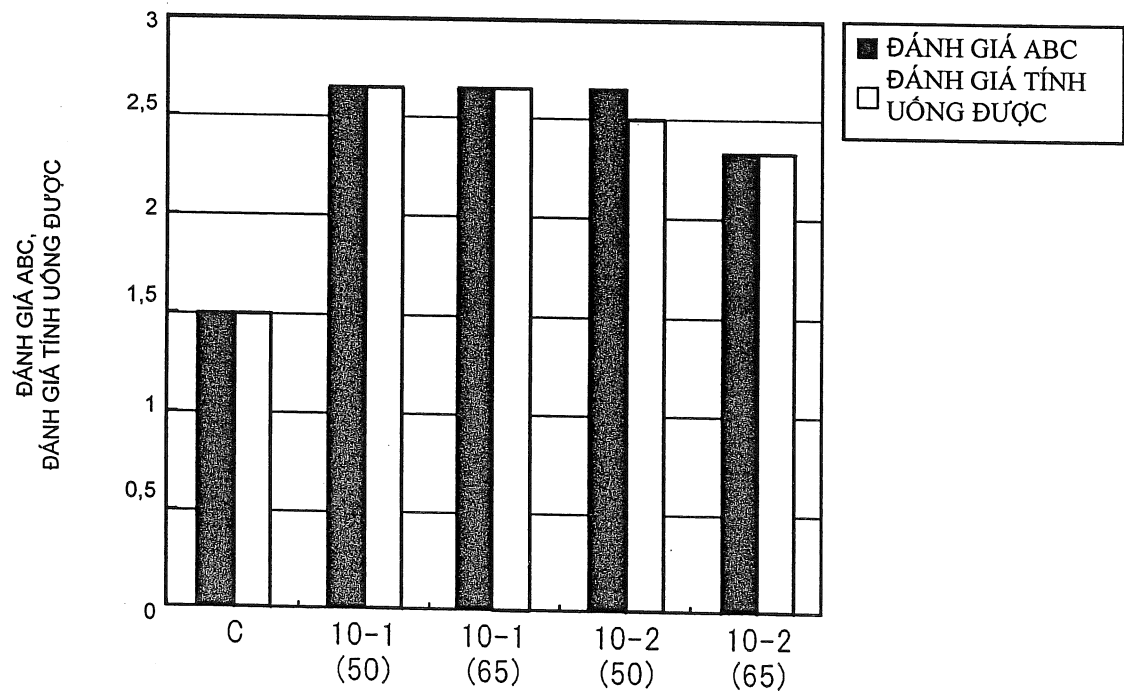


FIG.22



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SAPPORO BREWERIES LIMITED

<120> Đồ uống có ga và phương pháp sản xuất đồ uống này

<130>

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 1

Ala Glu Phe Val Glu Val Thr Lys
1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 2

Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala Phe Val Asp Lys
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 3

Leu	Val	Asn	Glu	Leu	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 4

Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	His	Phe	Lys
1				5					10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 5

Asp	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg
1				5						10		

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> BSA được phân cắt

<400> 6

Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Ile	Val	Arg
1					5					10		

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> BSA được phân cắt

<400> 7

His	Leu	Val	Asp	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys
1				5						10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Có bán trên thị trường

<400> 8

Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro
1				5		

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Có bán trên thị trường

<400> 9

Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
1				5				

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Có bán trên thị trường

<400> 10

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Có bán trên thị trường

<400> 11

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Có bán trên thị trường

<400> 12

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu Leu Val Tyr Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Có bán trên thị trường

<400> 13

Trp Leu Thr Gly Pro Gln Leu Ala Asp Leu Tyr His Ser Leu Met Lys
1 5 10 15

<210> 14
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Có bán trên thị trường

<400> 14

Tyr	Pro	Ile	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Pro	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Trp	Glu
1				5					10					15	

Ala	Trp	Ser	His	Phe	Phe	Lys
				20		