



(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)



1-0025663

(51)⁷ C12C 12/00; C12C 12/04

(13) B

(21) 1-2015-03642

(22) 07/03/2014

(86) PCT/EP2014/054415 07/03/2014

(87) WO2014/135673 12/09/2014

(30) 13158261.1 07/03/2013 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/12/2015 333A

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

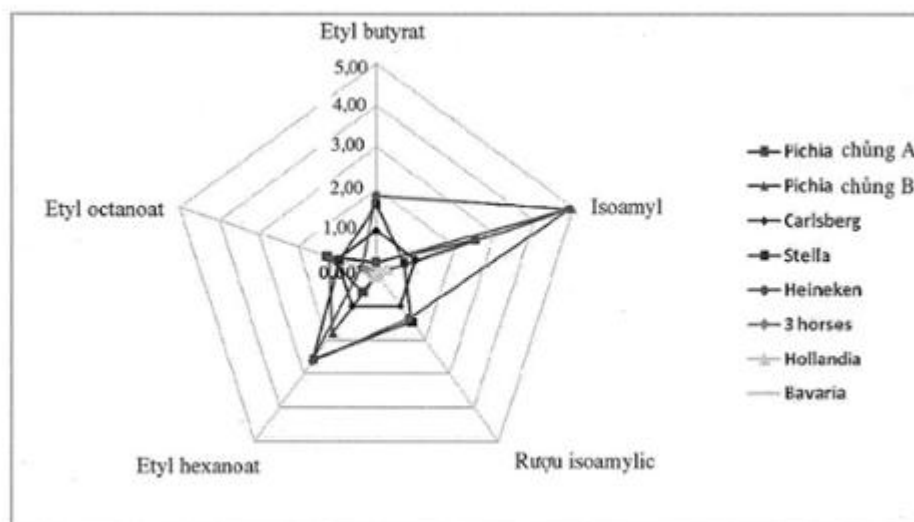
Boege Alle 10-12 DK-2970 Hoersholm, Denmark

(72) SAERENS Sofie (DK); SWIEGERS Jan Hendrik (DK).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG KHÔNG CÒN HOẶC CÓ ĐỘ CÒN THẤP

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất đồ uống không còn hoặc có độ còn thấp, với đặc tả hương vị rất gần với bia là ít nhất 4% (thể tích/thể tích) cồn, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng chủng nấm men *Pichia kluyveri*. Đặc biệt chủng nấm men *Pichia kluyveri* chỉ sử dụng glucoza trong dịch hèm, và có khả năng chuyển hoá cơ chất này thành các chất tạo hương vị đặc biệt với nồng độ cao, thường được tạo ra bởi *Saccharomyces ssp.* Là chủng nấm men được sử dụng để sản xuất bia. Bằng cách này, chủng nấm men *Pichia kluyveri* có thể được sử dụng để tạo ra đồ uống không cồn hoặc đồ uống có độ còn thấp, tùy thuộc vào mức glucoza trong dịch hèm. Các chất tạo hương vị chính được tạo ra bởi *Pichia kluyveri* trong quá trình lên men dịch hèm là isoamyl axetat, rượu isoamylic, etyl butyrat, etyl hexanoat và etyl octanoat.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp bằng cách lên men. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp chứa hàm lượng cao các chất tạo hương vị thu được từ quá trình lên men bao gồm bước lên men dịch hèm bằng chủng nấm men *Pichia kluyveri*, đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp thu được bằng phương pháp này và đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp chứa nồng độ cao các chất tạo hương vị đặc biệt như isoamyl axetat và etyl octanoat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do nhu cầu ngày càng tăng đối với thực phẩm và đồ uống có lợi hơn cho sức khỏe, nên việc làm giảm etanol trong đồ uống chứa cồn, đặc biệt là bia và rượu vang, đang rất được quan tâm.

Bia có độ cồn thấp, bia không cồn hoặc bia có độ cồn giảm (còn được gọi là bia nhẹ, bia không chứa cồn, bia tách cồn, bia nhỏ, cận bia) là các loại bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp nhưng vẫn tái tạo được hương vị đầy đủ của bia chuẩn thường chứa hơn 4% (thể tích/thể tích) cồn. Ở hầu hết các nước châu Âu, bia có độ cồn thấp được chia thành bia không cồn (alcohol-free beer) là loại chứa bằng hoặc ít hơn 0,5% (thể tích/thể tích) cồn, và bia có độ cồn thấp (alcohol-low beer) là loại chứa bằng hoặc ít hơn 1,2% (thể tích/thể tích) cồn. Ở Mỹ, bia không cồn có nghĩa là bia không chứa cồn, còn giới hạn trên của độ cồn bằng 0,5% (thể tích/thể tích) cồn thì tương ứng với cái gọi là bia tách cồn (non-alcoholic) hoặc cận bia (Montanari *et al.* 2009).

Việc chuyển hóa dịch hèm thành bia chứa cồn là kết quả của quá trình lên men bằng nấm men *Saccharomyces ssp.* dẫn đến việc tạo ra cồn và các chất tạo hương vị thu được từ quá trình lên men, như este (ví dụ, isoamyl axetat) và các cồn cao hơn. Isoamyl axetat là các chất tạo hương vị chính trong bia (Saerens *et al.* 2010). Việc kết hợp hương vị của các nguyên liệu thô, chủ yếu là mạch nha và hoa houblông, cùng với quá trình lên men, tạo nên hương và vị độc đáo của bia (Swiegers *et al.* 2007, Saerens *et al.* 2010).

Ngày nay, bia có độ cồn thấp thường được tạo ra bằng cách sản xuất bia nguyên chất (bia có độ cồn trên 4% (thể tích/thể tích)) và sau đó loại bỏ cồn bằng các quá trình vật lý (làm bay hơi cồn/chưng cất hoặc thẩm thấu ngược). Nhưng cũng có một số loại bia tách cồn hoặc bia không cồn, không có bước lên

men và một số loại khác được sản xuất đơn giản bằng cách pha loãng bia nguyên chất với nước. Do các quá trình vật lý gây ra hiện tượng bay hơi, hao hụt hoặc làm loãng các chất tạo hương vị thu được từ quá trình lên men (hoặc hoàn toàn không có các chất tạo hương vị thu được từ quá trình lên men như trong trường hợp của bia tách cồn hoặc bia không cồn không được lên men), các loại bia này thường có hương vị kém thơm ngon hơn so với bia nguyên chất hoặc có thể có vị giống dịch hèm không mong muốn (Zufall và Wackerbauer. 2000).

Bằng độc quyền sáng chế Đức số DD 288619 A5 mô tả việc sử dụng chủng nấm men *Pichia farinosa* để lên men dịch hèm bia không được ướp hoa hublông để thu được đồ uống không cồn có mùi trái cây.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu về các phương pháp cải tiến để sản xuất đồ uống lên men không cồn hoặc có độ cồn thấp trong đó các chất tạo hương vị mong muốn, như este và cồn bậc cao, có mặt với nồng độ lớn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ của các tác giả sáng chế rằng chủng nấm men *Pichia kluyveri*, chủng chỉ có khả năng lên men glucoza trong dịch hèm bia, có khả năng tạo ra nồng độ cao của các chất tạo hương vị mong muốn trong khi lượng etanol tạo ra rất nhỏ.

Các nấm men bia thuộc loài *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carlsbergensis* và *Saccharomyces cerevisiae* sử dụng cả glucoza lẫn maltoza, là các đường chính trong dịch hèm (Boulton and Quain. 2010), dẫn đến việc tạo ra cồn và các chất tạo hương vị trong quá trình lên men. Nồng độ đường trong dịch hèm càng cao, cồn và các chất tạo hương vị tạo ra sẽ càng nhiều. Để tạo ra ít cồn, giải pháp là sử dụng nấm men chỉ lên men glucoza và không lên men maltoza, nhờ đó chỉ tạo ra cồn từ glucoza. Glucoza có mặt trong dịch hèm với nồng độ thấp hơn nhiều so với maltoza (Bảng 1) và do đó từ cùng lượng dịch hèm so với khi sử dụng nấm men bia thông thường, ví dụ, *Saccharomyces pastorianus* hoặc *Saccharomyces carlsbergensis*, cồn sẽ được tạo ra với lượng ít hơn. Các loại nấm men này là đã biết và ví dụ về chúng bao gồm một số chủng nấm men *Saccharomyces* và chủng nấm men không phải là *Saccharomyces*, như *Saccharomycodes* ssp (Liu et al. 2011).

Tuy nhiên, việc chỉ có lượng tương đối nhỏ hương vị sẽ được tạo ra bởi các chủng nấm men này từ lượng glucoza có hạn sẽ làm cho bia có nồng độ chất tạo hương vị chính thấp hơn so với bia chứa nhiều hơn 4% (thể tích/thể tích) cồn.

Bảng 1. Phổ đường thông thường của dịch hèm (Stewart. 2010)

Tỷ lệ thành phần (%)	
Glucosa	10 – 15
Fructoza	1 – 2
Sucroza	1 – 2
Maltoza	50 – 60
Maltotrioza	15 – 20
Dextrin	20 – 30

Một cách để khắc phục được vấn đề này là xác định nấm men có khả năng tạo độ thơm cao mà không dùng maltoza để tạo ra các chất tạo hương vị thu được từ quá trình lên men thích hợp với nồng độ cao từ lượng glucosa có hạn, từ đó thu được các chất tạo hương vị chính có nồng độ tương tự hoặc cao hơn so với khi lên men hoàn toàn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng phương pháp này và chủng nấm men *Pichia kluyveri*, có thể sản xuất bia không cồn và bia có độ cồn thấp (theo luật EU) có hương vị giống như bia nguyên chất chuẩn. Điều này không thể đạt được bằng nấm men bia thông thường như *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces pastorianus* hoặc *Saccharomyces carlsbergensis*, quy trình loại bỏ cồn bằng phương pháp vật lý, pha loãng, hoặc bia được sản xuất từ cơ chất không được lên men.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp cải tiến để sản xuất đồ uống lên men không cồn hoặc có độ cồn thấp trong đó các chất tạo hương vị mong muốn, như este và cồn bậc cao, có mặt với nồng độ lớn.

Để đạt được mục đích này, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra dịch hèm; và
- b) lên men dịch hèm này bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* để thu được đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp thu được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp, trong đó đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp có hàm lượng isoamyl axetat là ít nhất 0,5ppm (mg/L).

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng chủng nấm men *Pichia kluyveri* để sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa quy trình đã được tối ưu hóa để sản xuất bia *Pichia kluyveri*. So sánh giữa quy trình sản xuất bia chuẩn (bên trái) và quy trình sản xuất bia *Pichia kluyveri* (bên phải). Các bước khác với quy trình sản xuất bia chuẩn được tô đậm.

Fig. 2 minh họa sự so sánh đặc tả hương vị giữa 5 loại bia không cồn khác nhau: 3 Horses, Hollandia, Bavaria (tất cả đều chứa 0% cồn) và bia được sản xuất bằng *Pichia kluyveri* chủng A (0,1% (thể tích/thể tích) cồn) và chủng B (0,2% (thể tích/thể tích) cồn). Bia Pilsner Carlsberg có độ cồn là 4,6 % (thể tích/thể tích) được sử dụng làm bia Pilsner tham chiếu và hai loại bia Pilsner khác cũng được sử dụng là: Stella (5,2% (thể tích/thể tích) cồn) và Heineken (5,0% (thể tích/thể tích) cồn). 5 chất tạo hương vị khác nhau được đo bằng GC-FID lấy mẫu pha hơi: isoamyl axetat, rượu isoamylic, etyl butyrat, etyl hexanoat và etyl octanoat. Nồng độ chất tạo hương vị trong bia Pilsner Carlsberg được sử dụng làm nồng độ tham chiếu và được cho bằng 1. Nồng độ hương vị trong tất cả các loại bia được đưa vào cùng hệ thống chia độ để có thể so sánh các giá trị.

Fig. 3 thể hiện sự so sánh đặc tả hương vị giữa 4 loại bia khác nhau: bia không cồn được lên men bằng *Pichia kluyveri* chủng A (0,1% (thể tích/thể tích) cồn), bia có độ cồn thấp được lên men bằng *Pichia kluyveri* chủng A (0,7% (thể tích/thể tích) cồn), bia Pilsner Carlsberg (4,6% (thể tích/thể tích) cồn) được sử dụng làm bia Pilsner tham chiếu (đối chứng) và bia mạch nha (1,8% (thể tích/thể tích) cồn). 5 chất tạo hương vị khác nhau được đo bằng GC-FID lấy mẫu pha hơi: isoamyl axetat, rượu isoamylic, etyl butyrat, etyl hexanoat và etyl octanoat. Nồng độ chất tạo hương vị trong bia Pilsner Carlsberg được sử dụng làm nồng độ tham chiếu và được cho bằng 1. Nồng độ hương vị trong 3 loại bia được đưa vào cùng hệ thống chia độ để có thể so sánh các giá trị.

Fig. 4 minh họa nồng độ diacetyl trong các thử nghiệm bia được lên men bằng *Pichia kluyveri* chủng A và nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 5 thể hiện sự phát triển của tế bào nấm men trong quá trình lên men.

Fig. 6 thể hiện nồng độ của isoamyl axetat etyl decanoat và phenyletyl axetat trong tất cả các sản phẩm lên men được lên men bằng *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri*, cũng như trong dịch hèm cơ bản (có và không có hoa hublông). w/o = không có.

Fig. 7 minh họa nồng độ của isobutyl axetat và butyl axetat trong tất cả các sản phẩm lên men được lên men bằng *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia*

kluyveri, cũng như trong dịch hèm cơ bản (có và không có hoa hublông). w/o = không có.

Fig. 8 thể hiện nồng độ của isobutanol, 1-butanol và rượu isoamylic trong tất cả các sản phẩm lên men bằng *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri*, cũng như trong dịch hèm cơ bản (có và không có hoa hublông). w/o = không có.

Fig. 9 thể hiện nồng độ của axit hexanoic, octanoic và decanoic trong tất cả các sản phẩm lên men được lên men bằng *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri*, cũng như trong dịch hèm cơ bản (có và không có hoa hublông). w/o = không có.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng chủng nấm men *Pichia kluyveri* có khả năng làm tăng nồng độ chất tạo hương vị mong muốn trong các đồ uống được điều chế bằng cách lên men dịch hèm bằng chủng nấm men *Pichia kluyveri*. Đặc biệt, đã làm tăng được nồng độ chất tạo hương vị mong muốn đối với bia, như isoamyl axetat, rượu isoamylic và etyl octanoat.

Bất ngờ là, việc tăng nồng độ chất tạo hương vị bia này xảy ra khi sử dụng chủng nấm men của loài *Pichia kluyveri* mà không có mặt chủng nấm men sản xuất bia thông thường, như chủng nấm men của giống *Saccharomyces* và *Brettanomyces*.

Quy trình sản xuất bia là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thể hiện theo cách sau (xem Fig. 1); mạch nha được điều chế từ hạt ngũ cốc nảy mầm khô (chủ yếu là lúa mạch hoặc lúa mì) và được nghiền thành bột ngũ cốc có thể chứa các thành phần phụ không được ủ mạch nha. Bột ngũ cốc này được ủ (trộn với nước và ngâm) để cho phép enzym trong mạch nha chuyển hóa tinh bột thành đường. Hạt ngũ cốc và các thành phần phụ được tách khỏi dịch hèm dạng lỏng trong quy trình được gọi là quy trình lọc dịch bia. Có thể bỏ qua bước tạo ra mạch nha và ủ mạch nha bằng cách bổ sung nước vào dịch chiết mạch nha. Sau khi bổ sung hoa hublông và/hoặc các thành phần khác như thảo mộc và đường, dịch hèm được đun sôi (hoa hublông cũng có thể được bổ sung sau khi đun sôi), làm nguội và làm toi. Sau đó, dịch hèm được đưa vào thùng lên men và được lên men bằng cách bổ sung nấm men bia. Bước lên men sơ cấp, thường kéo dài từ 5 đến 10 ngày, tiếp theo có thể là bước lên men thứ cấp bằng cách sử dụng nấm men bia. Sau khi lên men, bia tươi hay bia “xanh” được điều chỉnh cho thích hợp, tùy ý được lọc và cacbonat hóa. Bia này được nạp vào các chai và tùy ý được tiệt trùng theo phương pháp Pasteur.

Hoa hublông có thể được bổ sung vào dịch hèm để cân bằng vị ngọt của mạch nha với vị đắng và mang lại cho bia hương vị và mùi thơm mong muốn. Một số giống hoa hublông hiện đang có bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Ahtanum, Amarillo, Apollo, Bravo, Calypso, Cascade, Centennial, Chelan, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Comet, Crystal, El Dorado, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Mosaic, Newport, Nugget, Palisade, San Juan, Santiam, Satus, Simcoe, Sonnet Golding, Sterling, Summit, Super Galena, Tillicum, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bramling Cross, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilgrim, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettnang, Spalt, Ella, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Hallertau Aroma, Kohatu, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Rakau, Riwaka, Southern Cross, Sticklebract, Summer, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Hallertau Herkules, Hallertau Magnum, Hallertau Taurus, Magnum, Merkur, Opal, Perle, Saphir, Select, Smaragd, Tradition, Bor, Junga, Lublin, Marynka, Premiant, Sladek, Strisselspalt, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Styrian Golding, Sybilla, Tardif de Bourgogne và Sorachi Ace.

Phương pháp sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) tạo ra dịch hèm; và
- b) lên men dịch hèm này bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* để thu được đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp.

Thuật ngữ “đồ uống có độ cồn thấp” trong bản mô tả này được định nghĩa là chất lỏng để uống có hàm lượng cồn lớn hơn 0,5% (thể tích/thể tích) cồn và không vượt quá 1,2% (thể tích/thể tích) cồn.

Thuật ngữ “đồ uống không cồn” trong bản mô tả này được định nghĩa là chất lỏng để uống có hàm lượng cồn không vượt quá 0,5% (thể tích/thể tích) cồn.

Thuật ngữ “dịch hèm” trong bản mô tả này có nghĩa thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này và dùng để chỉ chất lỏng chứa đường được chiết ra từ quá trình ủ của quy trình sản xuất bia.

Nồng độ glucoza trong dịch hèm quan trọng đối với tỷ lệ cồn thu được trong đồ uống và có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi quá trình ủ, bằng

cách bổ sung enzym và bằng các phương pháp khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án được ưu tiên, dịch hèm có nồng độ glucoza nằm trong khoảng từ 0,01% đến 3% (khối lượng/thể tích), ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1,0% (khối lượng/thể tích).

Tốt hơn là, công đoạn lên men ở bước b) được thực hiện trong các điều kiện vô trùng (lên men có kiểm soát) và chỉ bằng cách bổ sung các loài thuộc chủng nấm men *Pichia kluyveri*.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định nồng độ cần cấy của chủng nấm men *Pichia kluyveri* thích hợp để sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp theo phương pháp này.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng nấm men *Pichia kluyveri* được cấy với nồng độ là ít nhất 1×10^4 CFU/ml (đơn vị tạo thành khuẩn lạc/ml), như là ít nhất 5×10^4 CFU/ml, như là ít nhất 1×10^5 CFU/ml, như là ít nhất 5×10^5 CFU/ml, như là ít nhất 1×10^6 CFU/ml, như là ít nhất 5×10^6 CFU/ml.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp này còn bao gồm bước a1) bổ sung vào dịch hèm ít nhất một giống hoa hublông trước khi lên men dịch hèm này bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri*.

Theo một phương án được ưu tiên khác, quá trình lên men dịch hèm bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* được thực hiện trong ít nhất 7 ngày, như trong ít nhất 14 ngày, như trong ít nhất 21 ngày, như trong ít nhất 28 ngày.

Theo một phương án được ưu tiên khác, quá trình lên men dịch hèm bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18°C đến 22°C.

Theo phương án khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước c) đun sôi và tiệt trùng chai chứa đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp theo phương pháp Pasteur.

Tốt hơn là, ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* có khả năng lên men glucoza mà không phải là maltoza hoặc maltotrioza. Điều này có thể được thử nghiệm bằng cách cho sinh trưởng chủng nấm men trong môi trường nuôi cấy chỉ có maltoza hoặc maltotrioza.

Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28; chủng A), được nộp lưu ngày 24 tháng 08 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia (the National Measurement Institute), 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Trường Đại học Auckland, School of Biological

Sciences, Auckland 1142, New Zealand, với số hiệu lưu giữ là V06/022711, và *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71), được nộp lưu ngày 24 tháng 08 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Trường Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, với số hiệu lưu giữ là V06/022712.

Tốt hơn, nếu đồ uống không còn hoặc có độ cồn thấp là bia không còn hoặc bia có độ cồn thấp.

Thuật ngữ “bia” được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ ít nhất các loại bia được sản xuất từ dịch ngâm được điều chế từ ngũ cốc được ủ mạch nha cũng như dịch ngâm được điều chế từ ngũ cốc không được ủ mạch nha, và dịch ngâm được điều chế từ hỗn hợp của ngũ cốc được ủ mạch nha và ngũ cốc không được ủ mạch nha. Thuật ngữ “bia” cũng dùng để chỉ bia được sản xuất bằng các thành phần phụ và bia có hàm lượng cồn cao nhất có thể.

Thuật ngữ “bia có độ cồn thấp” trong bản mô tả này dùng để chỉ bia có hàm lượng cồn lớn hơn 0,5% và không vượt quá 1,2% (thể tích/thể tích) cồn.

Thuật ngữ “bia không cồn” trong bản mô tả này dùng để chỉ bia có hàm lượng cồn không vượt quá 0,5% ABV.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất đồ uống không còn hoặc có độ cồn thấp có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống không còn hoặc có độ cồn thấp là bia không còn hoặc bia có độ cồn thấp.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất đồ uống không còn hoặc có độ cồn thấp, trong đó đồ uống có nồng độ isoamyl axetat là ít nhất 0,5ppm (phần triệu; mg/L), như là ít nhất 0,6ppm, như là ít nhất 0,7ppm, như là ít nhất 0,8ppm, như là ít nhất 0,9ppm, như là ít nhất 1,0ppm, như là ít nhất 1,2ppm, như là ít nhất 1,4ppm, như là ít nhất 1,6ppm, như là ít nhất 1,8ppm, như là ít nhất 2,0ppm, như là ít nhất 2,5ppm, như là ít nhất 3,0ppm, như là ít nhất 3,5ppm, như là ít nhất 4,0ppm, như là ít nhất 4,5ppm, như là ít nhất 5,0ppm.

Tốt hơn là, đồ uống không còn hoặc có độ cồn thấp có nồng độ etyl octanoat là ít nhất 10 ppb (phần tỷ; µg/L), như là ít nhất 11 ppb, như là ít nhất 12 ppb, như là ít nhất 13 ppb, như là ít nhất 14 ppb, như là ít nhất 15 ppb, như là ít nhất 20 ppb, như là ít nhất 25 ppb, như là ít nhất 30 ppb, như là ít nhất 40 ppb, như là ít nhất 50 ppb, như là ít nhất 60 ppb, như là ít nhất 70 ppb, như là ít nhất 80 ppb, như là ít nhất 90 ppb, như là ít nhất 100 ppb.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống có độ cồn lớn hơn 0,5% (thể tích/thể tích) cồn và không vượt quá 1,2% (thể tích/thể tích) cồn.

Theo một phương án được ưu tiên khác, đồ uống có độ cồn không vượt quá 0,5% (thể tích/thể tích) cồn.

Tốt hơn là, đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp là bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng chủng nấm men *Pichia kluyveri* để sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp là bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp

Thiết lập quá trình lên men

Cả bia không cồn và bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng 2 chủng *Pichia kluyveri* khác nhau (chủng A và chủng B). Tổng 2 thử nghiệm đã được thực hiện:

- 1) So sánh bia không cồn được sản xuất bằng cách lên men bằng *Pichia kluyveri* chủng A và chủng B.
- 2) Bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng cách lên men bằng *Pichia kluyveri*, chủng A.

Phương pháp sản xuất bia ban đầu là giống nhau đối với cả hai thử nghiệm, chỉ khác là bổ sung hoa hublông. Bia không cồn được sản xuất trên quy mô 1500 lít. Bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng cách lên men bằng *Pichia kluyveri*, chủng A và chủng B, trên quy mô 1000 lít. Cơ sở cho toàn bộ bia là hỗn hợp của 4 loại mạch nha khác nhau: mạch nha pilsner 20%, mạch nha lúa mì 38%, mạch nha Munich 38% và mạch nha Cara 50 4%. Nồng độ đường ban đầu được đo bằng máy đo độ cồn của bia Anton Paar là 8,3°Plato.

Tất cả các chủng nấm men được cấy ở mật độ 5×10^6 CFU/ml.

Đối với bia không cồn, so sánh giữa chủng A và chủng B của *Pichia kluyveri*, chỉ có dịch chiết hoa hublông được sử dụng để tạo vị đắng. Quá trình lên men được thực hiện ở 20°C trong khoảng ba tuần.

Đối với bia có độ cồn thấp, dịch chiết hoa hublông được sử dụng để tạo vị đắng và vào thời điểm cuối của công đoạn nấu dịch hèm, hoa hublông Tettnang và Amarillo được sử dụng là hoa hublông có khả năng tạo độ thơm. Quá trình lên men được thực hiện ở 21°C. Quá trình lên men này được thực hiện trong ba tuần, và vào thời điểm giữa của quá trình lên men, hoa hublông

Tettnang và Amarillo được bổ sung là trảng hoa hublông để ủ hoa hublông khô. Nhiệt độ lên men được giảm xuống 4°C trong quá trình ủ hoa hublông khô.

Sau khi lên men, toàn bộ bia được làm lạnh đến 4°C trong vài ngày, được lọc và tiệt trùng theo phương pháp Pasteur. Sau đó, các bia này được nạp vào các chai.

Nồng độ glucoza ban đầu là >1% trong thử nghiệm thứ nhất, nhưng dao động trong khoảng 0,5% trong hai thử nghiệm cuối và nồng độ glucoza giảm rất chậm trong quá trình lên men. Vào cuối quá trình lên men, hầu hết toàn bộ glucoza được nấm men tiêu thụ và chuyển hóa thành etanol.

Tổng quan về quy trình sản xuất bia được thể hiện trên Fig. 1, trong đó quy trình này được so sánh với quy trình sản xuất bia thông thường. Bước quan trọng trong quy trình sản xuất bia ‘mới’ là:

- 1) Điều chỉnh các điều kiện ủ để tối ưu hóa nồng độ glucoza trong dịch hèm
- 2) Đảm bảo rằng hoa hublông được bổ sung là vô trùng, bằng cách sử dụng hoa hublông dạng viên tròn hoặc dịch chiết hoa hublông, ủ hoa hublông không khô, vì điều này có thể gây nhiễm bẩn bia thành phẩm
- 3) Thời gian lên men dài hơn để tối ưu hóa đặc tả hương vị của bia
- 4) Tiệt trùng chai theo phương pháp Pasteur để tránh nguy cơ nhiễm bẩn do mức maltoza cao trong bia thành phẩm.

Do chủng *Pichia kluyveri* là chủng lên men rất chậm, việc giữ được dịch hèm và bia vô trùng là điều rất quan trọng. Việc bổ sung bất kỳ của hoa hublông cần được thực hiện theo cách vô trùng, nghĩa là ít nhất 30 phút trước khi kết thúc đun sôi dịch hèm. Việc ủ hoa hublông khô (bổ sung hoa hublông sau khi đun sôi) không nên áp dụng trong sản xuất bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp vì nó có nguy cơ gây nhiễm bẩn bia. Do rất nhiều đường còn lại trong bia thành phẩm, cần tiến hành bảo quản kỹ để tránh hỏng bia.

Thử nghiệm sản xuất bia quy mô phòng thí nghiệm

Thử nghiệm lên men quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện trong 500mL dịch hèm. Dịch hèm này được điều chế từ dịch chiết mạch nha lúa mì (Brewferm). Dịch chiết mạch nha được trộn với nước để đạt đến lượng đường ban đầu là 10°P (Plato) được đo bằng máy đo độ cồn của bia Anton Paar. Hoa hublông dạng viên tròn Amarillo được bổ sung vào dịch hèm qua thiết bị lọc cà phê kín và dịch này được đun sôi trong 30 phút để chiết hương vị hoa hublông và bổ sung vị đắng vào bia. Hoa hublông dạng viên tròn được bổ sung vào để đạt 23 EBU (Đơn vị vị đắng châu Âu). Sau khi đun sôi, thiết bị lọc cà phê được lấy ra khỏi dịch hèm và dịch hèm này được chuyển vào các chai dung tích 1L,

được đậy kín bằng khóa nước. Quá trình lên men được thực hiện ở 20°C. Sau 5 ngày lên men, mẫu được lấy để đo điaxetyl.

Phân tích hương vị

Phương pháp sắc ký khí lấy mẫu pha hơi kết hợp với dò ion hóa ngọn lửa (HSGC-FID) được sử dụng để đo axetat este, etyl este và cồn bậc cao hơn trong các mẫu. Các mẫu này được phân tích bằng hệ GC Perkin Elmer có định cỡ bằng bộ lấy mẫu lấy mẫu pha hơi. GC này được trang bị cột HP-FFAP (25m x 0,20mm x 0,33µm, Agilent Technologies, Đức). Buồng tiêm mẫu chia dòng-không chia dòng được sử dụng và giữ ở 180°C. Các mẫu này được làm nóng trong 30 phút ở 70°C trong bộ lấy mẫu tự động lấy mẫu pha hơi trước khi tiêm (nhiệt độ của kim tiêm: 110°C). Khí mang là heli. Chương trình SOF hoạt động như sau: sau khi khởi động ở 60°C, nhiệt độ tủ sấy được tăng lên sau 2 phút từ 60°C đến 230°C ở 45°C/phút và cuối cùng được giữ ở 230°C trong 5 phút. Trong quá trình chạy chương trình GC, tốc độ chảy không đổi (10mL/phút) của khí mang (He) được duy trì. Nhiệt độ FID được giữ không đổi ở 220°C. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Turbochrom.

GC-MS lấy mẫu pha hơi được sử dụng để phân tích điaxetyl. Về nguyên lý, phương pháp này giống như phương pháp được sử dụng để dò các chất tạo hương vị, nhưng việc chia dòng quá mức gây chuyển vận thêm heli, dẫn đến tốc độ chảy tăng và do đó làm cho nồng độ của hợp chất trên cột cao hơn. Điểm khác nhau nữa đó là lọ nhỏ bị nén tác động trong 0,03 phút dưới dạng bể lớn khí mang và chương trình GC khởi động ở nhiệt độ là 90°C.

Phân tích etanol và tỷ trọng

Việc phân tích etanol và tỷ trọng được thực hiện bằng hệ phân tích độ cồn bia của Anton-Paar.

Kết quả

Bảng 2: Nồng độ (tính theo ppm; mg/L) etyl butyrat, isoamyl axetat, rượu isoamylic, etyl hexanoat và etyl octanoat của 6 loại bia trên thị trường và bia được sản xuất bằng *Pichia kluyveri* chủng A và *Pichia kluyveri* chủng B.

	Etyl butyrat	Isoamyl axetat	Rượu isoamylic	Etyl hexanoat	Etyl octanoat
Carlsberg	1,10	1,00	34,0	0,04	0,10
Stella	2,14	0,71	50,0	0,11	0,10
Heineken	2,02	4,87	46,0	0,10	0,09
3 Horses	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
Hollandia	0,00	0,26	3,2	0,00	0,00
Bavaria	0,00	0,18	2,0	0,00	0,00
Bia mạch	0,71	0,21	11	0,01	0,01

nha					
Pichia A – không cồn	0,43	1,96	2,00	0,03	0,12
Pichia B – không cồn	0,26	4,94	2,00	0,07	0,13
Pichia A – độ cồn thấp	0,27	2,50	1,80	0,02	0,13

Bia không cồn được sản xuất bằng cách sử dụng Pichia kluyveri trong quá trình lên men

Để sản xuất bia không cồn, quy trình sản xuất bia bằng chủng nấm men *Pichia kluyveri* được thực hiện (xem nguyên liệu và phương pháp). Chủng *Pichia kluyveri* được sử dụng để sản xuất bia có tỷ lệ cồn thấp hơn 0,5%. Theo thuật ngữ châu Âu, bia này được xem là bia không cồn. Thử nghiệm sản xuất bia này được thực hiện trên quy mô 1000 lít bằng *Pichia kluyveri* chủng A và chủng B và nhiệt độ lên men thấp hơn một chút là 20°C (xem Fig. 1 về chi tiết quy trình sản xuất bia). Toàn bộ glucoza được tiêu thụ vào cuối quá trình lên men và bia được sản xuất bằng chủng A có tỷ lệ cồn là 0,1%. Bia được sản xuất bằng chủng B có tỷ lệ cồn là 0,2%. Thời gian lên men là ba tuần.

Hai bia cuối được sử dụng để phân tích hương vị. Để đánh giá về đặc tả hương vị của bia không cồn trên thị trường, 4 loại bia không cồn trên thị trường cũng được phân tích hương vị. 3 loại bia trên thị trường là 3 Horses, Hollandia và Bavaria. Các thành phần trong bia là như sau:

- Bia 3 Horses không cồn truyền thống: nước, lúa mạch, mạch nha, ngô và hoa hublông.
- Bia mạch nha không cồn Hollandia: nước, lúa mạch, mạch nha, maltoza và dịch chiết hoa hublông.
- Bia không cồn Bavaria: nước khoáng tinh khiết, mạch nha lúa mạch, maltoza và hoa hublông.

Đối với mẫu đối chứng, đặc tả hương vị của bia Pilsner Carlsberg (4,6% (thể tích/thể tích) cồn) được sử dụng. Để so sánh bia thử nghiệm được sản xuất bằng *Pichia kluyveri* với các loại bia Pilsner trên thị trường khác, đặc tả hương vị của 2 bia Pilsner khác được đo: bia Stella premium lager (5,2% (thể tích/thể tích) cồn) và bia Heineken lager (5,0% (thể tích/thể tích) cồn).

Từ danh mục trên đây có thể thấy rằng các thành phần chính của bia không cồn là nước, mạch nha (đôi khi thành phần phụ là lúa mạch không được ủ mạch nha) và hoa hublông. Các thành phần chính giống với các thành phần trong thử nghiệm với *Pichia kluyveri*.

Kết quả về phân tích hương vị được thể hiện trên Fig. 2. Nồng độ của 5 chất tạo hương vị là isoamyl axetat, rượu isoamylic, etyl butyrat, etyl hexanoat và etyl octanoat được chỉ ra, mỗi loại được chia độ sao cho nồng độ chất tạo hương vị tương ứng đối với bia Pilsner Carlsberg là 1.

Fig. 2 cho thấy rõ ràng toàn bộ bia không cồn trên thị trường có nồng độ chất tạo hương vị của bia thông thường rất thấp so với bia Pilsner Carlsberg và so với ba loại bia Pilsner khác. Tuy nhiên, bia được sản xuất bằng cách lên men chủng *Pichia kluyveri* có nồng độ chất tạo hương vị bia đặc biệt tương tự với bia Pilsner tham chiếu, cụ thể là rượu isoamylic, etyl hexanoat và etyl octanoat. Etyl butyrat có mặt với lượng thấp hơn (nồng độ bằng một nửa) và isoamyl axetat có với lượng cao hơn (nồng độ gấp đôi hoặc hơn). So với các loại bia Pilsner khác, có vẻ như nồng độ isoamyl axetat trong bia *Pichia kluyveri* cũng như nồng độ etyl octanoat vẫn cao hơn. Tuy nhiên, nồng độ etyl butyrat và etyl hexanoat trong bia Pilsner cao hơn so với trong bia *Pichia kluyveri*. Các hợp chất này có trong bia với nồng độ rất thấp và ít quan trọng hơn so với nồng độ isoamyl axetat. Nồng độ rượu isoamylic không khác nhiều giữa bia *Pichia kluyveri* và bia Pilsner, nhưng hầu như không có trong bia không cồn. Khi so sánh toàn bộ đặc tả hương vị của bia *Pichia kluyveri* với bia không cồn và bia Pilsner, có vẻ như đặc tả hương vị của bia *Pichia kluyveri* là gần giống với bia có từ 4,6 đến 5,2% (thể tích/thể tích) cồn so với đặc tả hương vị của bia bất kỳ trong số các bia không cồn trên thị trường được đo.

Do các chất tạo hương vị này có hương vị trái cây tương tự, chúng tác động theo kiểu hiệp đồng. Nhóm tham gia nếm vị bia *Pichia kluyveri* bao gồm những nhà sản xuất bia và những người tiêu thụ bia đã cho thấy hương vị này rất giống bia và bia này ngon hơn so với bia không cồn trên thị trường.

Bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng cách lên men bằng chủng Pichia kluyveri

Bia này được sản xuất từ 1500 lít dịch hèm và nhiệt độ lên men là 21°C (xem Fig. 1 về chi tiết quy trình sản xuất bia). Thử nghiệm này được thực hiện với *Pichia kluyveri* chủng A. Toàn bộ glucoza được tiêu thụ vào cuối quá trình lên men và mức etanol cuối là 0,7%. Thời gian lên men là ba tuần.

Từ Fig. 3 có thể thấy rằng cả bia không cồn và bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng cách lên men bằng *Pichia kluyveri* chủng A có đặc tả hương vị tương tự, nghĩa là cả bia không cồn và bia có độ cồn thấp đều có đặc tả hương vị rất gần với đặc tả hương vị của bia Pilsner bình thường. Ngoài ra, các este chính, isoamyl axetat, etyl butyrat, etyl hexanoat, etyl octanoat và rượu isamylic xác định đặc tả hương vị.

Đo diacetyl được sản xuất bằng cách lên men bằng chủng Pichia kluyveri

Để đảm bảo *Pichia kluyveri* không tạo ra hương vị lạ đáng kể bất kỳ trong bia, việc tạo ra hương vị lạ quan trọng nhất trong bia, diacetyl, được đo trong thử nghiệm sản xuất bia quy mô phòng thí nghiệm bằng cách lên men chỉ bằng *Pichia kluyveri* chủng A, so với bia được sản xuất bằng cách lên men bằng chủng *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 4).

Từ Fig. 4 thấy rõ rằng *Pichia kluyveri* tạo ra diacetyl ít hơn so với chủng lên men bia *Saccharomyces cerevisiae*. Điều này là quan trọng vì diacetyl thường liên quan đến hương vị lạ trong bia. Đặc biệt, trong bia không cồn và bia có độ cồn thấp là những bia không có cồn, ngưỡng giới hạn vị của diacetyl có lẽ thấp hơn nhiều so với các loại bia mạnh bình thường.

Kết luận

Kết quả về đặc tả hương vị của bia không cồn và bia có độ cồn thấp được sản xuất bằng cách lên men bằng *Pichia kluyveri* cho thấy rằng chủng nấm men này là lý tưởng dùng để sản xuất bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp. Đặc biệt, việc tạo ra lượng este lớn, từ nồng độ glucoza rất thấp, là đặc tính Đặc biệt thấy được ở chủng *Pichia kluyveri*. Cùng với isoamyl axetat, các este khác có nồng độ cao cũng giúp sản xuất được bia không cồn hoặc bia có độ cồn thấp có đặc tả hương vị giống bia.

Ví dụ 2

Saccharomycodes ludwigii đã được đề cập trong Branyik et al. (2012) là giống thành công nhất, ngoài *Saccharomyces*, được sử dụng để sản xuất bia không cồn trên quy mô công nghiệp.

Để so sánh các đặc tính của *Pichia kluyveri* với các đặc tính của *Saccharomycodes ludwigii* trong sản xuất bia có độ cồn thấp, thử nghiệm thứ hai được thiết lập:

Nguyên liệu và phương pháp

Nuôi cấy nấm men

Môi trường nuôi cấy loại hai nấm men (*Pichia kluyveri* chủng A và chủng nấm men *Saccharomycodes ludwigii*) được điều chế trong YPD (glucoza 2%, pepton 1% và dịch chiết nấm men 0,5%), với pH được điều chỉnh là 5,5. Môi trường YPD được hấp ở 121°C trong 20 phút.

Môi trường nuôi cấy nấm men này được dàn trải trên các đĩa YGC (Sigma-Aldrich) và một khuẩn lạc được cấy vào 5mL môi trường YPD. Các môi trường nuôi cấy này được để phát triển qua đêm trong tủ ẩm lắc ở 30°C và cấy vào 500mL YPD. Sau 2 ngày, mẫu được lấy để đếm tế bào có thể cấy vào

môi trường nuôi cấy nấm men với số lượng tế bào ban đầu giống như trong môi trường dịch hèm.

Thử nghiệm sản xuất bia quy mô phòng thí nghiệm

Thử nghiệm lên men quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện trong 500mL dịch hèm. Dịch hèm này được điều chế từ dịch chiết mạch nha Pilsner (Brewferm). Dịch chiết mạch nha được trộn với nước để đạt đến lượng đường ban đầu là 7°P (Plato) được đo bằng máy đo độ cồn của bia Anton Paar. Tổng cộng 10 lít dịch hèm được điều chế bằng cách này.

Trong thiết lập thử nghiệm thứ nhất, dịch hèm được đun sôi trong 60 phút mà không được bổ sung hoa hublông. Trong thiết lập thử nghiệm thứ hai, 4,5g Amarillo, 4,5g Cascade và 2g hoa hublông dạng viên tròn Tettnanger được bổ sung vào dịch hèm và đun sôi trong 60 phút để tạo ra vị đắng. 10 phút trước khi kết thúc công đoạn đun sôi, 1,5g Cascade, 1,5g Amarillo và 1g hoa hublông dạng viên tròn Tettnanger được bổ sung là hoa hublông có khả năng tạo độ thơm.

Sau khi đun sôi, dịch hèm được chuyển vào các chai dung tích 2L (1600mL dịch hèm cho mỗi chai), được đậy kín bằng khóa nước.

Môi trường nuôi cấy nấm men được cấy ở mật độ 1×10^6 CFU/ml và quá trình lên men được thực hiện ở 20°C. Sau 5 ngày lên men, mẫu được lấy để phân tích hương vị.

Phân tích etanol

Etanol được đo bằng kit phân tích sinh học enzym etanol của Boehringer Mannheim.

Phân tích hương vị

Việc phân tích hương vị được thực hiện tại Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (Zaragoza, Spain). Các hợp chất thơm phụ được biểu thị theo µg/L (ppb) và được đo bằng cách chiết pha rắn và sắc ký khí bằng phép phát hiện phổ khối, trong khi các hợp chất thơm chính được biểu thị theo mg/L (ppm) và được đo bằng sắc ký khí-dò ion hóa ngọn lửa sau khi chiết các hợp chất trong diclometan.

Kết quả

Quá trình lên men quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện trong hai loại dịch hèm Pilsner: dịch hèm Pilsner không được bổ sung hoa hublông và dịch hèm Pilsner được bổ sung chất tạo vị đắng và hoa hublông có khả năng tạo độ thơm (Cascade, Amarillo và Tettnanger) (xem nguyên liệu và phương pháp). Hai chủng nấm men khác nhau được thử nghiệm: *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri*. Môi trường nuôi cấy nấm men được cấy với số

lượng tế bào là 1E6 CFU/ml sau khi nuôi cấy chúng trong môi trường YPD. Tổng cộng 4 quá trình lên men khác nhau được thực hiện:

- 1) *Saccharomyces ludwigii* trong dịch hèm không có hoa hublông (*S. ludwigii* không có hoa hublông)
- 2) *Saccharomyces ludwigii* trong dịch hèm có hoa hublông (*S. ludwigii* có hoa hublông)
- 3) *Pichia kluyveri* trong dịch hèm không có hoa hublông (*P. kluyveri* không có hoa hublông)
- 4) *Pichia kluyveri* trong dịch hèm có hoa hublông (*P. kluyveri* có hoa hublông)

Tất cả các quá trình lên men được thực hiện trong 5 ngày ở 20°C.

Trong quá trình lên men, số lượng tế bào được đo mỗi ngày để theo dõi sự phát triển của nấm men (Fig. 5).

Từ Fig. 5 thấy rõ rằng cả hai chủng nấm men đều vẫn sống trong dịch hèm có lẫn dịch hèm không có hoa hublông. *Pichia kluyveri* phát triển rõ rệt, so với *Saccharomyces ludwigii*, với số lượng tế bào ổn định trong toàn bộ quá trình lên men.

Sau 5 ngày, nồng độ etanol được đo trong tất cả các sản phẩm lên men (Bảng 3).

Bảng 3: Nồng độ etanol trong tất cả 4 sản phẩm lên men

Sản phẩm lên men	% etanol /thể tích/thể tích)
<i>S. ludwigii</i> không có hoa hublông	0,3
<i>S. ludwigii</i> có hoa hublông	0,3
<i>P. kluyveri</i> không có hoa hublông	0,1
<i>P. kluyveri</i> có hoa hublông	0,1

Bảng 3 cho thấy rằng cả *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri* đều tạo ra lượng etanol rất thấp. *Pichia kluyveri* có vẻ tốt hơn trong việc sản xuất bia không cồn, vì chủng này sinh trưởng đến số lượng tế bào lớn hơn nhưng lại tạo ra ít cồn hơn so với *Saccharomyces ludwigii*.

Các sản phẩm lên men ở ngày thứ 5 cũng được phân tích về đặc tả hương vị (các Fig. 6, 7, 8 và 9). Các chất tạo hương vị quan trọng nhất cho bia là este và cồn bậc cao hơn.

Các Fig. 6 và 7 cho thấy nồng độ este trong tất cả các sản phẩm lên men thành phẩm cũng như trong dịch hèm cơ bản có và không có hoa hublông. Tất cả nồng độ este là cao nhất trong các sản phẩm lên men bằng *Pichia kluyveri*, cả trong sản phẩm có và không có hoa hublông. Trong trường hợp của isoamyl,

phenyletyl, isobutyl và butyl axetat, *Pichia kluyveri* tạo ra lượng este cao hơn khi không bổ sung hoa hublông, so với etyl decanoat. Đặc biệt là mức isoamyl axetat và phenyletyl axetat rất cao. Isoamyl axetat tạo ra hương chuối, trong khi phenyletyl axetat tạo ra nhiều mùi hương của hoa, mật ong. Cả hai loại hợp chất este này đều là các hợp chất cần thiết trong bia. Lưu ý rằng kết quả được thể hiện trong bản mô tả này là nồng độ của este sau 5 ngày lên men, và các nồng độ này sẽ giảm theo thời gian trong bia thành phẩm. Điều quan trọng là nồng độ este phải cao khi bắt đầu lên men để sản xuất bia có hương vị trái cây trong khoảng thời gian dài hơn, vì các hợp chất este này bị thủy phân theo thời gian trong bia thành phẩm.

Nồng độ dầu rượu tạp, được mô tả trên Fig. 8, khá giống nhau giữa các sản phẩm lên men bằng *Saccharomyces ludwigii* và *Pichia kluyveri*. Chỉ có nồng độ rượu isoamylic cao hơn trong các sản phẩm lên men bằng *Saccharomyces ludwigii*, có lẽ vì hợp chất này không được chuyển thành isoamyl acetate, như trong trường hợp các sản phẩm lên men từ *Pichia kluyveri*.

Fig. 9 thể hiện ba loại axit là các chất tạo hương vị bất lợi trong bia. Đặc biệt, axit decanoic tạo ra vị ôi, mùi pho mát cho bia và do đó nó là axit không mong muốn. Rõ ràng là *Saccharomyces ludwigii* tạo ra lượng lớn các axit này, điều này làm cho chúng không thích hợp để dùng trong sản xuất bia.

Kết luận

Thử nghiệm sản xuất bia quy mô phòng thí nghiệm bằng hai chủng nấm men không phải là *Saccharomyces* khác nhau cho thấy rõ ràng là để sản xuất bia không cồn thì *Pichia kluyveri* là phù hợp hơn so với *Saccharomyces ludwigii*. *Pichia kluyveri* tạo ra ít cồn hơn, nhiều hợp chất este mong muốn hơn và ít axit không mong muốn hơn so với *Saccharomyces ludwigii*.

Lưu giữ

Chủng *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 hoặc chủng A) và PK-KR2 (JT3.71) được nộp lưu ngày 24 tháng 08 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia (the National Measurement Institute), 51-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Trường Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, và với số hiệu lưu giữ là V06/022711 và V06/022712 như được mô tả trong WO 2009/110807.

Tài liệu tham khảo

DD 288619

WO 2009/110807

Boulton, C.M. and Quain, D. 2010. Brewing yeast and fermentation. Blackwell publishing Ltd.

Branyik, T, Silva, D.P., Baszczyn, M., Lehnert, R., Almeida e Silva, J.B., 2012. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. Journal of Food Engineering 108,493-506.

Liu, Y., Li, H., Du, J.-H. 2011. Non-alcoholic Beer Production by *Saccharomyces ludwigii*. Food Science, 32: 186-190.

Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H., Fantozzi, P., 2009. Production of alcohol-free beer. In: Preedy, V.R. (Ed.), Beer in Health and Disease Prevention. Elsevier Inc., Burlington, MA, 61–75.

Saerens S.M., Delvaux F.R., Verstrepen K.J., Thevelein J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Biotechnology 3:165-77.

Stewart, G. Wort glucose, maltose or maltotriose – do brewer's yeast strains care which one? Institute of Brewing and Distilling. Asia Pacific Section. 31st Asia Pacific Convention 2010. (<http://www.ibdasiapac.com.au/asia-pacific-activities/convention-proceedings/2010/results.html>)

Swiegers, J.H., S.M.G. Saerens, I.S. Pretorius. 2007. The development of yeast strains as tools to adjust the flavor of fermented beverage to market specifications. Havkin D. and Belanger F. Biotechnology in flavor production. Blackwell Publishing Ltd.

Zufall C, and Wackerbauer K. 2000. Process engineering parameters for the dealcoholisation of beer by means of falling film evaporation and its influence on beer quality. Monatsschrift für Brauwissenschaft 53:124–137.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp với hàm lượng cồn không vượt quá 1,2% (thể tích/thể tích) và nồng độ isoamyl axetat là ít nhất 0,5 mg/L, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra dịch hèm; và
- b) lên men dịch hèm này bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* để thu được đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp trong các điều kiện vô trùng và chỉ bằng cách bổ sung các loài thuộc chủng nấm men *Pichia kluyveri*.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước a) bổ sung vào dịch hèm ít nhất một giống hoa hublông trước khi lên men dịch hèm này bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri*.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quá trình lên men dịch hèm bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* được thực hiện trong ít nhất 7 ngày.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quá trình lên men dịch hèm bằng ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18°C đến 22°C.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước c) đun sôi và tiệt trùng chai chứa đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp theo phương pháp Pasteur.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất một chủng nấm men *Pichia kluyveri* có khả năng lên men glucoza mà không phải là maltoza hoặc maltotrioza.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất một chủng *Pichia kluyveri* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 hoặc chủng A) được nộp lưu ngày 24 tháng 08 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia (the National Measurement Institute), 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Trường Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, với số hiệu lưu giữ là V06/022711, và chủng *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71) được nộp lưu ngày 24 tháng 08 năm 2006 tại Viện đo lường quốc gia, 541-65 phố Clarke, South Melbourne, Victoria 3205, Úc, bởi Trường Đại học Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, với số hiệu lưu giữ là V06/022712.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó đồ uống không cồn hoặc có độ cồn thấp là bia.

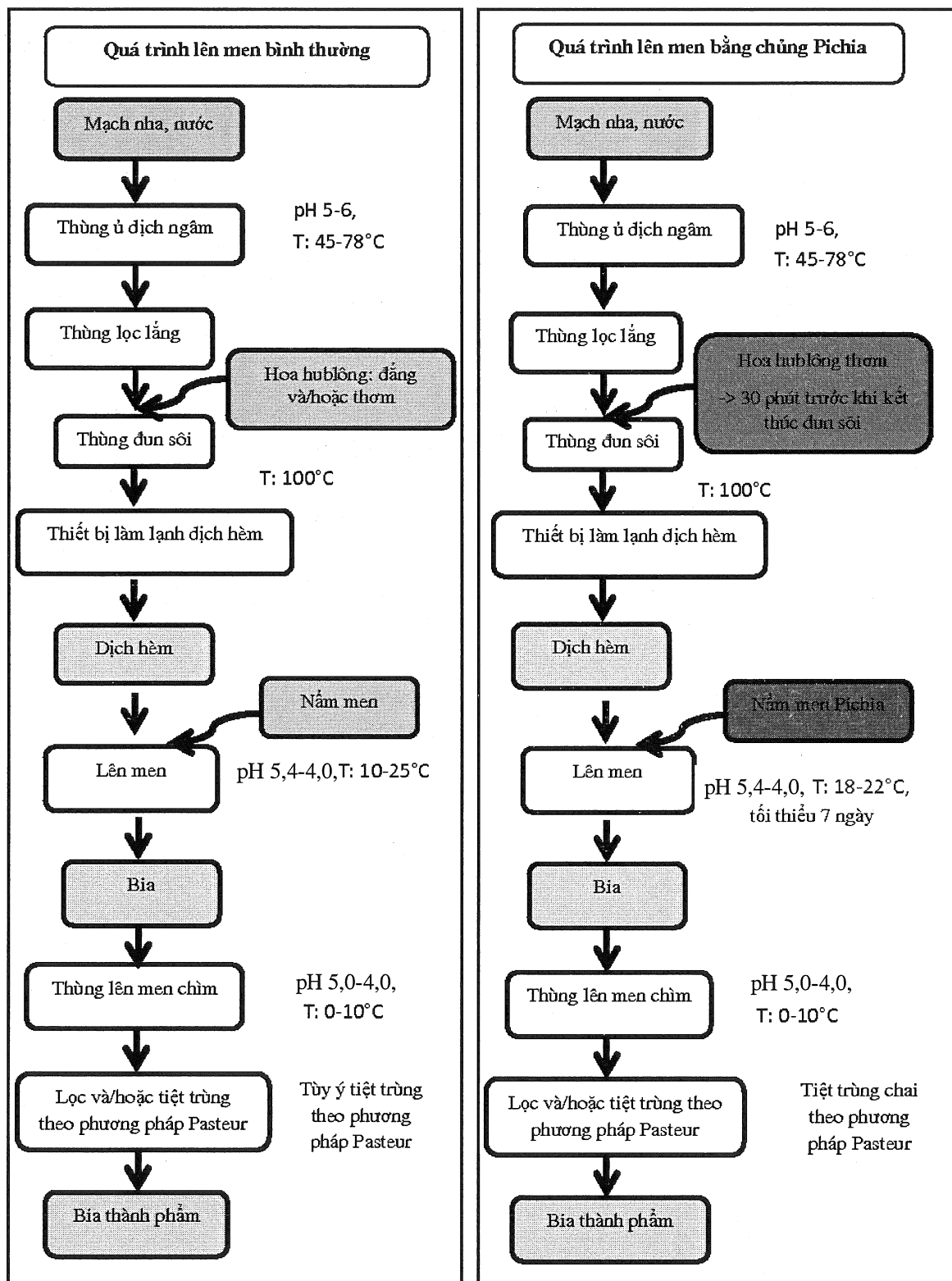


Fig. 1

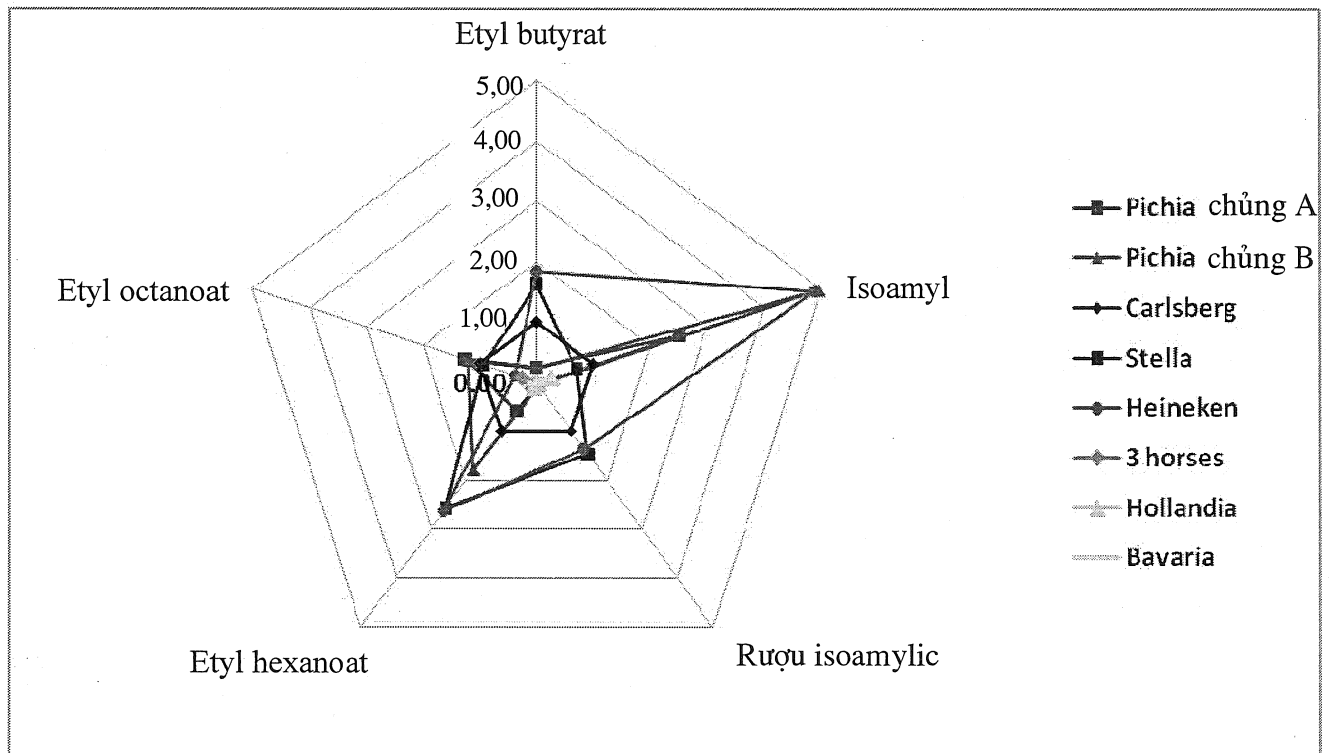


Fig. 2

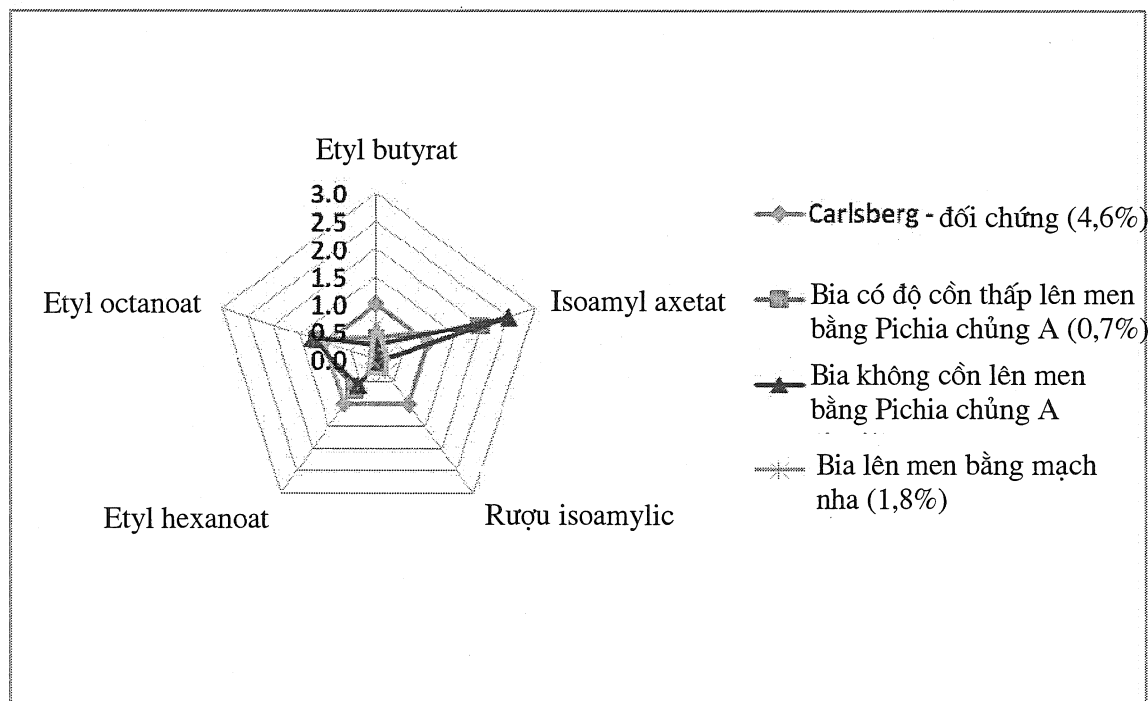


Fig. 3

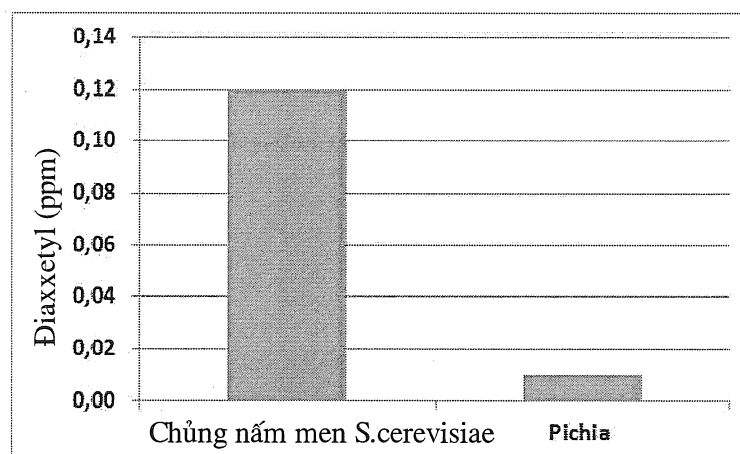


Fig. 4

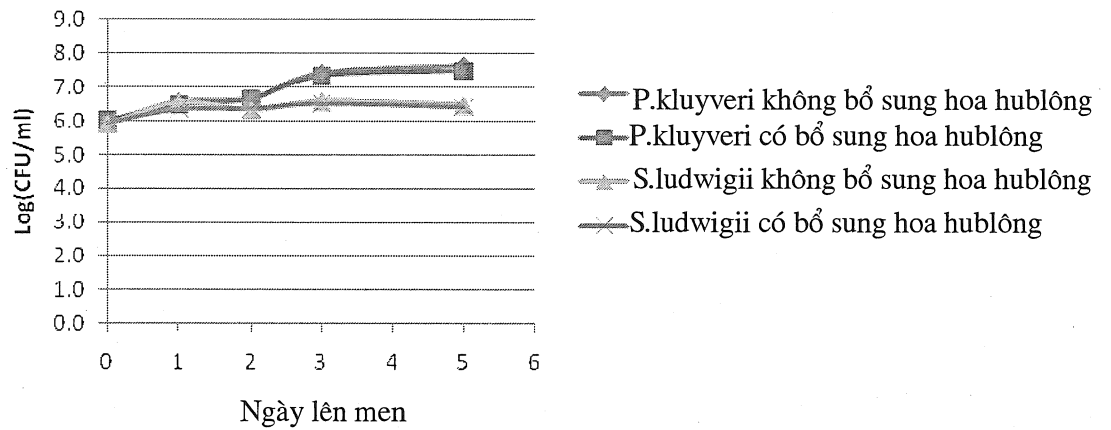


Fig. 5

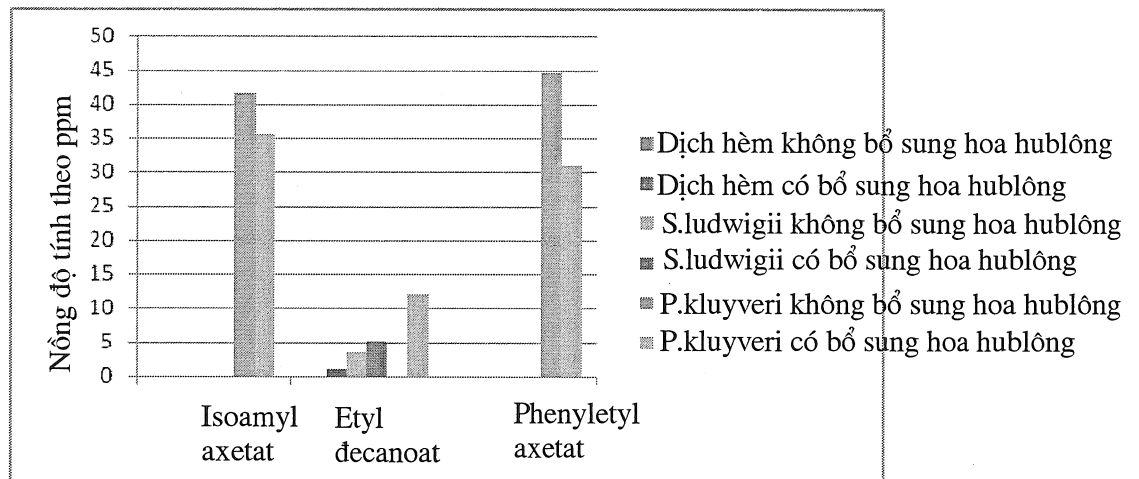


Fig. 6

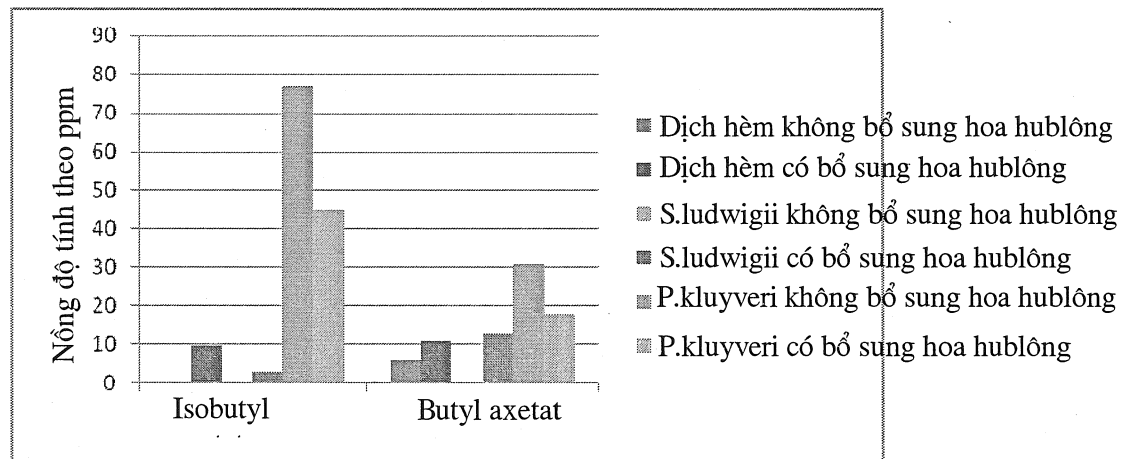


Fig. 7

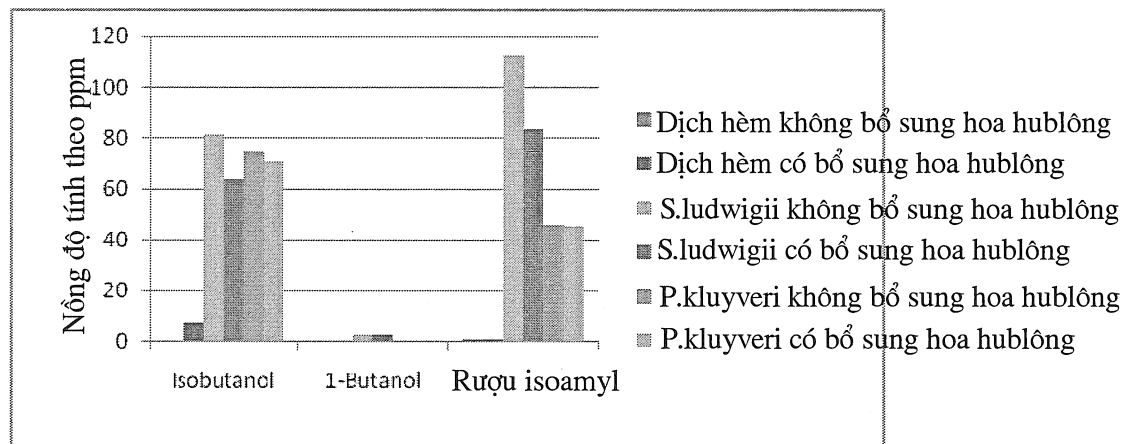


Fig. 8

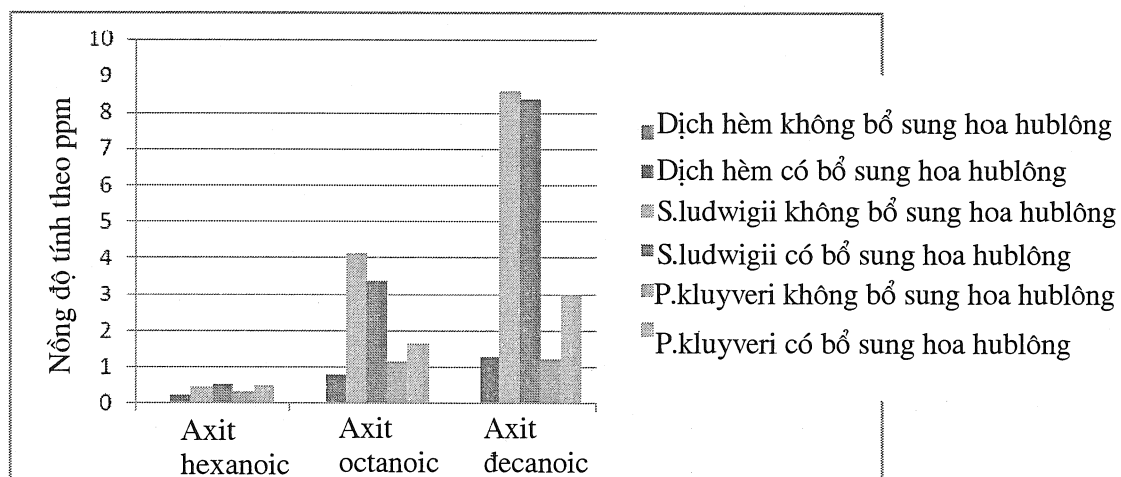


Fig. 9