



(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)



1-0025702

(51)⁷ A23L 1/23; A23L 1/22

(13) B

(21) 1-2015-01240

(22) 25/02/2014

(86) PCT/KR2014/001490 25/02/2014

(87) WO/2015/012466 29/01/2015

(30) 10-2013-0086977 23/07/2013 KR

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/05/2016 338A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) LEE, Sung Hun (KR); EOM, So Youn (KR); PARK, Jae Seung (KR); OH, Eun Seon (KR); LEE, Kwang Hee (KR); JANG, Suk Min (KR); KANG, Dae Ik (KR); CHUNG, Won Dae (KR).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT TẠO VỊ TRUNG TÍNH TỰ NHIÊN, CHẤT TẠO VỊ TRUNG TÍNH TỰ NHIÊN ĐƯỢC SẢN XUẤT TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ THỰC PHẨM BAO GỒM CHẤT TẠO VỊ TRUNG TÍNH TỰ NHIÊN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên, cụ thể là phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên bằng cách sử dụng dịch lên men inozin-5'-monophosphat (IMP) hoặc dịch lên men axit glutamic thu được nhờ quy trình lên men hai bước, bao gồm bước thứ nhất lên men bằng nấm và bước thứ hai lên men bằng vi khuẩn, chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất bằng phương pháp trên, và thực phẩm có chứa chất tạo vị trung tính tự nhiên. Chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất theo phương pháp của sáng chế bằng cách sử dụng nguyên liệu thô tự nhiên nên an toàn cho người sử dụng và có thể được bổ sung vào thực phẩm để tạo ra vị ngon và mùi thơm nhẹ từ đó cải thiện vị của thực phẩm.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên, cụ thể hơn là phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên sử dụng dịch lên men inozin-5'-monophosphat (IMP: inosine-5'-monophosphate) hoặc dịch lên men axit glutamic thu được nhờ quy trình lên men hai bước bao gồm bước thứ nhất lên men bằng nấm và bước thứ hai lên men bằng vi khuẩn, chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất bằng phương pháp trên và thực phẩm có chứa chất tạo vị trung tính tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit amin và peptit được sử dụng làm thành phần chất tạo vị. Trong những năm gần đây, chất tạo vị tự nhiên chứa axit amin và peptit được chiết xuất bằng cách lên men nguồn protein thực vật như đậu tương, lúa mì hay ngô bởi vi sinh vật như nấm, vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn lactic hoặc nấm men và thủy phân sản phẩm lên men được thực hiện theo nhiều cách khác nhau.

Thông thường, công nghệ được phát triển để cải thiện thành phần chất tạo vị được chiết xuất (axit amin và peptit) bằng cách tăng độ thủy phân nguồn protein thực vật hoặc tăng năng lực cạnh tranh về giá bằng cách tăng năng suất về khối lượng. Tuy nhiên, khi chỉ nguồn protein thực vật được sử dụng thì nhược điểm là chất tạo vị được tạo ra không có thành phần axit nucleic, do đó chất tạo vị có vị umami kém. Ngoài ra, chất tạo vị cần chứa axit glutamic cùng với axit nucleic như inosin monophosphat (IMP) hoặc guanosin monophosphat (GMP) để làm tăng giá trị thương phẩm của chúng.

Trong những năm gần đây, để khắc phục hạn chế nói trên của sản phẩm thủy phân protein thực vật, các nguyên liệu chứa axitnucleic tự nhiên như cao nấm men thường được sử dụng. Tuy nhiên, cao nấm men có thể ảnh hưởng xấu đến hương vị vốn có của thực phẩm được chế biến do mùi vị lạ bắt nguồn từ mùi lên men đặc trưng của chúng và hàm lượng axit nucleic của chúng bị giới hạn (hàm lượng axit nucleic tối

đa: 20%). Ngoài ra, hỗn hợp của nguyên liệu protein thực vật với cao nấm men để sử dụng cho thực phẩm chế biến tự nhiên có khả năng cạnh tranh về giá kém so với chất tạo vị thông thường như mono-natri glutamat (MSG), axit nucleic IG, hoặc protein thực vật thủy phân (HVP).

Trong khi đó, IMP cùng với GMP là hợp chất được sử dụng rộng rãi làm gia vị thực phẩm. Khi IMP được sử dụng, cụ thể là mono-natri glutamat (MSG), nó có khả năng cải thiện đáng kể vị của thực phẩm. Do đó, IMP là hợp chất tạo vị dựa trên axit nucleic được chú ý nhiều để làm hợp chất tạo vị.

Phương pháp lên men IMP và GMP để sử dụng làm hợp chất tạo vị bao gồm phương pháp phân giải ARN (axit ribonucleic) nấm men và phương pháp sản xuất IMP và GMP bằng hai bước (lên men và thủy phân hóa học) sau khi sản xuất inosin và guanosin. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, ở nhiều nước trong đó có châu Âu, tiêu chuẩn cho chất tạo vị tự nhiên được nâng cao và các quy định trở nên khắt khe hơn, và do đó chất tạo vị được sản xuất không chỉ từ thành phần tự nhiên mà còn được sản xuất bằng quá trình xử lý hóa học hoặc bổ sung các thành phần phụ gia không được công nhận là chất tạo vị tự nhiên. Vì lý do này, thành phần axit nucleic tự nhiên nên được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp trực tiếp lên men đường bằng vi khuẩn.

Trong trường hợp như vậy, tác giả sáng chế đã hết sức nỗ lực để sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên không chứa các thành phần phụ gia mà không cần thực hiện bất kỳ quy trình hóa học nào, và kết quả là tác giả sáng chế đã tìm ra rằng khi dịch lên men IMP hoặc dịch lên men axit glutamic được sản xuất bằng quy trình lên men hai bước gồm bước lên men thứ nhất sử dụng nấm và bước lên men thứ hai sử dụng vi khuẩn, thì nhiều chất tạo vị hữu hiệu có thể được sản xuất ngay khi chỉ dịch lên men được sử dụng cho phản ứng tiếp theo, qua đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kĩ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên không chứa các thành phần bổ sung mà không cần thực hiện bất kỳ quá trình xử lý hóa học nào và bằng cách sử dụng dịch lên men IMP hoặc dịch lên men axit glutamic được tạo thành bởi bước lên men thứ nhất nhờ nấm và bước lên men thứ hai nhờ vi khuẩn.

Mục tiêu tiếp theo của sáng chế là sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên theo phương pháp trên.

Mục tiêu khác của sáng chế là sản xuất thực phẩm có chứa chất tạo vị trung tính tự nhiên nói trên.

Để đạt được các mục tiêu trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên, phương pháp bao gồm các bước: (a) lên men nguồn protein thực vật bằng nấm để thu nhận dịch lên men ngũ cốc; (b) lên men dịch lên men ngũ cốc bằng vi khuẩn để thu nhận dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic; (c) thẩm tách bằng điện dịch lên men IMP; và (d) trộn dịch lên men axit glutamic của bước (b) và dịch lên men IMP của bước (c).

Fig.1 là sơ đồ minh họa phương pháp sản xuất chất tạo vị tự nhiên theo sáng chế.

Cụ thể, dịch lên men axit glutamic, dịch lên men IMP và dịch lên men ngũ cốc được tạo thành bởi bước lên men thứ nhất do lên men nấm và bước lên men thứ hai do vi khuẩn, và trải qua bước thứ ba trong đó thực hiện quá trình phản ứng hoặc xử lý phù hợp cho từng chất tạo vị từ đó tạo ra từng chất tạo vị tự nhiên.

Như vậy, đặc trưng của sáng chế là dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic tự nhiên được sử dụng làm nguyên liệu thô để sản xuất chất tạo vị tự nhiên thông qua quy trình lên men hai bước bao gồm bước lên men thứ nhất bởi nấm và bước lên men thứ hai bởi vi khuẩn.

Bước lên men thứ nhất bởi nấm là bước sản xuất peptit và axit amin bằng cách sử dụng nguồn protein. Khi chỉ có bước lên men thứ nhất bởi nấm được thực hiện, thì lượng lớn peptit và axit amin mới có thể được sản xuất và theo đó axit glutamic được sử dụng làm chất tạo vị có thể được sản xuất. Tuy nhiên, nhược điểm của bước lên men thứ nhất là hợp chất axit nucleic như IMP hoặc GMP vốn tạo vị umami không được tạo thành. Ngoài ra còn tồn tại nhược điểm là khi nguồn protein thực vật được sử dụng, protein chỉ trải qua quá trình phân giải nên peptit và axit amin được sản xuất phụ thuộc vào nồng độ hoặc hàm lượng protein trong nguồn protein. Cụ thể, khi đậu được sử dụng thì hàm lượng axit glutamic trong dịch lên men được sản xuất sẽ nhỏ hơn 10% và khi gluten lúa mì được sử dụng thì hàm lượng axit glutamic trong dịch lên men được sản xuất sẽ nhỏ hơn 15%.

Trong khi đó, bước lên men thứ hai nhờ vi khuẩn là bước tạo thành dịch lên men axit nucleic và dịch lên men axit glutamic. Khi chỉ có bước lên men thứ hai bởi vi khuẩn được thực hiện, axit nucleic và axit glutamic có thể được sản xuất một cách hiệu quả, nhưng nhược điểm của nó là hàm lượng các axit amin khác và peptit được sản xuất có nồng độ dưới 1%, và do đó dịch lên men bằng vi khuẩn không thể được sử dụng làm chất tạo vị mặc dù nó có vị umami tốt. Nói cách khác, nhược điểm của nó là, để có thể sử dụng dịch lên men thu được chỉ bởi quá trình lên men vi khuẩn làm chất tạo vị, thì các chất phụ gia cần được bổ sung vào dịch lên men để dịch lên men có thể được sử dụng cho thực phẩm.

Theo đó, sáng chế đã phát triển phương pháp sản xuất chất tạo vị tự nhiên nhằm khắc phục những hạn chế của quá trình lên men nấm và quá trình lên men vi khuẩn bằng cách chỉ sử dụng dịch lên men được tạo thành mà không cần bổ sung bất kì chất phụ gia nào và không cần thực hiện bất kì quá trình xử lý hóa học nào.

Để sản xuất dịch lên men axit nucleic và axit glutamic bằng cách sử dụng quy trình lên men hai bước, nhiều muối khoáng, axit amin, vitamin cùng với nguồn cacbon và nguồn nitơ cần được đáp ứng. Cụ thể, theo kỹ thuật trước đây, cao nấm men hoặc protein thực vật thủy phân (HVP) được sử dụng làm nguồn nitơ, nhưng trường hợp này có nhược điểm là dịch lên men thu được có mùi và vị lạ và năng suất hơi thấp. Ngoài ra, hàm lượng của thành phần tạo vị trong dịch nuôi cấy thu được cũng như hương vị tổng thể rất khác nhau phụ thuộc vào các nguyên liệu khác nhau được sử dụng để lên men bằng vi khuẩn. Do đó, theo sáng chế, dịch lên men ngũ cốc (sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc) nhận được nhờ lên men nấm (bước lên men thứ nhất) và có thể chứa nhiều axit amin và peptit khác nhau có vai trò là nguồn nitơ, được sử dụng làm cơ chất cho bước lên men thứ hai bằng vi khuẩn.

Trong các quy trình thông thường để sản xuất axit nucleic hoặc MSG bằng cách sử dụng vi khuẩn, điều quan trọng nhất là chỉ làm tăng nồng độ axit glutamic và MSG trong dịch nuôi cấy và tăng năng suất của chúng. Điều này làm tăng có hiệu quả vị umami, nhưng trong một số trường hợp, nó làm ảnh hưởng xấu đến vị của hợp chất tạo vị thu được. Tuy nhiên, các chất tạo vị tự nhiên khác nhau được sản xuất bằng cách sử dụng 3 bước theo sáng chế có ưu điểm là hương vị có thể được cải thiện bằng cách kiểm soát nồng độ IMP và axit glutamic vốn là các thành phần tạo vị umami cũng như kiểm soát tốt các thành phần axit amin, sacarit, axit hữu cơ và ion vô cơ, v.v..

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ minh họa toàn bộ quy trình sản xuất chất tạo vị tự nhiên.

Fig.2 minh họa quy trình thủy phân adenosin monophosphat (AMP) bằng axit để thay thế adenin bằng nguyên liệu dạng thực phẩm tự nhiên theo sáng chế.

Fig.3 minh họa con đường chuyển hóa tạo ra canxi pantotenat (CAPA) để thay thế β -alanin bằng nguyên liệu dạng thực phẩm tự nhiên.

Fig.4 minh họa mức độ sinh trưởng của tế bào vi khuẩn trong trường hợp nguồn dinh dưỡng được bổ sung là protein thực vật được phân giải bởi quá trình lên men bằng nấm theo sáng chế và trong trường hợp nguồn dinh dưỡng protein thực vật không được bổ sung.

Fig.5. minh họa kết quả đánh giá các thuộc tính cảm quan trước và sau quá trình thẩm tách bằng điện.

Fig.6 minh họa kết quả so sánh các thuộc tính cảm quan giữa chất tạo vị trung tính theo sáng chế và cao nấm men.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, từng bước của phương pháp theo sáng chế để sản xuất chất tạo vị tự nhiên sẽ được mô tả.

Bước (a) của phương pháp theo sáng chế là bước lên men nguồn protein thực vật nhờ nấm để thu được dịch lên men ngũ cốc.

Trong bước (a), quá trình lên men nấm được thực hiện bằng cách sử dụng nguồn protein thực vật, qua đó thu được dịch lên men ngũ cốc có chứa nhiều axit amin và peptit khác nhau bao gồm các thành phần như glutamin, thành phần mà có thể được sử dụng làm nguồn nitơ trong bước lên men thứ hai nhờ vi khuẩn. Cụ thể, nấm được nuôi cấy bằng cách sử dụng nguyên liệu ngũ cốc làm nguồn cơ chất để sản xuất dịch nuôi cấy tế bào chứa proteaza, sau đó dịch này được bổ sung vào nguồn protein thực vật và thủy phân protein, qua đó tạo thành sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc. Tiếp đó, sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc được lọc và tế bào được loại bỏ, từ đó thu được dịch lên men ngũ cốc. Sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc có thể có hàm lượng nitơ tổng số khoảng 2% (w/v: khối lượng/thể tích) hoặc cao hơn để cung cấp nguồn nitơ cho bước lên men thứ hai bằng vi khuẩn.

Đối với nguồn protein thực vật, bất kì nguyên liệu nào được biết đến trong công nghệ vi sinh vật cũng có thể được sử dụng miễn là nó có thể được lên men bởi nấm. Một số nguồn protein thực vật cụ thể (nhưng không giới hạn nguyên liệu của sáng chế) như đậu tương, ngô, gạo, gluten lúa mì, v.v.. Trong khi đó, khi gluten lúa mì được sử dụng, nó có ưu điểm làm tăng năng suất lên men vi khuẩn, bởi vì lúa mì chứa một lượng lớn glutamin. Do đó, tốt nhất là gluten lúa mì được sử dụng làm nguồn protein thực vật.

Đối với nấm, bất cứ nấm nào cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là chúng có thể lên men nguồn protein thực vật để tạo thành dịch lên men ngũ cốc theo sáng chế. Nấm được sử dụng theo sáng chế nên là *Aspergillus* sp., và tốt nhất là *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus sojae*, nhưng không giới hạn ở đó.

Trong thí nghiệm của sáng chế, bước lên men thứ nhất do nấm được thực hiện bằng cách sử dụng *Aspergillus sojae* CJCC_080124P (KCCM11026P) như được mô tả trong Đơn đăng kí bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-1191010 (tương ứng với Công bố đơn quốc tế số WO 2011-046249).

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dịch lên men ngũ cốc” dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách lên men nguồn protein thực vật (ngũ cốc) nhờ nấm. Dịch lên men ngũ cốc có thể được sử dụng làm cơ chất cho bước lên men thứ hai nhờ vi khuẩn và cũng có thể được sử dụng trong bước cuối cùng sản xuất chất tạo vị bằng cách lọc dịch lên men ngũ cốc và loại bỏ tế bào sau khi lên men. Do đó, dịch lên men ngũ cốc có thể được sử dụng cho hai mục đích như được mô tả ở trên.

Bước (b) là bước dùng vi khuẩn để lên men dịch lên men ngũ cốc thu được trong bước (a) để tạo thành dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic. Cụ thể, dịch lên men ngũ cốc nhận được trong bước lên men thứ nhất nhờ nấm được sử dụng làm cơ chất để vi khuẩn lên men, và dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic có thể được tạo thành bằng cách sử dụng dịch lên men ngũ cốc có bổ sung nguồn cacbon để tiếp tục lên men nhờ vi khuẩn.

Quá trình lên men vi khuẩn có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn thông thường được biết đến trong công nghệ vi sinh vật, và tốt nhất là có thể gồm ba bước: nuôi cấy trong bình, nuôi cấy quy mô lớn, và nuôi cấy chính. Cụ thể, nuôi cấy trong bình và nuôi cấy mở rộng được thực hiện bằng cách sử dụng môi

trường nuôi cấy sơ cấp và môi trường nuôi cấy thứ cấp để đạt được quy mô lớn, sau đó lên men vi khuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng dịch lên men ngũ cốc của bước (a) làm cơ chất trong môi trường nuôi cấy chính trong khi cung cấp liên tục đường bổ sung, qua đó nhận được dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic.

Môi trường dùng cho lên men vi khuẩn có thể bao gồm nguồn cacbon như glucoza, fructoza hoặc nguyên liệu tương tự. Cụ thể, môi trường dùng cho sản xuất dịch lên men axitglutamic có thể bao gồm đường thô làm nguồn cacbon. Môi trường có thể bao gồm muối khoáng, vitamin, axit amin và các nguyên liệu cần thiết và thành phần môi trường có thể thay đổi tùy thuộc vào sản phẩm lên men mong muốn là dịch lên men IMP hay dịch lên men axit glutamic.

Cụ thể, khi dịch lên men IMP được sản xuất, môi trường nuôi cấy chính có thể bao gồm glucoza, fructoza, magie sulfat, axit phosphoric, kali hydroxit và dịch lên men ngũ cốc. Dựa vào thể tích tổng số của môi trường, tốt nhất là môi trường chính bao gồm: 4,4-5,2% glucoza, 3,7-4,3% fructoza, 1,3-1,7% magie sulfat, 2,0-2,4% axitphosphoric, 1,4-1,8% kali hydroxit, và 0,5-0,9% dịch lên men ngũ cốc. Ngoài ra, khi dịch lên men axit glutamic được sản xuất, môi trường nuôi cấy chính có thể bao gồm glucoza, fructoza, đường thô, betain, magie sulfat, kali phosphat, và axit phosphoric, và dựa trên khối lượng tổng số của môi trường, tốt nhất là môi trường bao gồm: 0,5-0,7% glucoza, 0,9-1,1% fructoza, 4,5-5,5% đường thô, 0,005-0,015% betain, 0,3-0,5% magie sulfat, 0,8-1,0% kali phosphat, và 0,2-0,4% axit phosphoric.

Ngoài ra, nếu cần thiết, môi trường có thể bao gồm một lượng nhỏ các thành phần khác như sắt sulfat, magie sulfat, đồng sulfat, kẽm sulfat, canxi pantotenat (CAPA), nicotinamit (NCA), biotin, canxi clorit, tiamin, vitamin C và các thành phần cần thiết khác. Ví dụ điển hình về từng môi trường bao gồm các thành phần như vậy được trình bày trên các bảng 5-8 và 9-12.

Kết quả của bước lên men thứ nhất nhờ nấm (a), nguồn protein thực vật được phân giải thành axit amin và peptit, và các ion vô cơ như canxi, magie và sắt phosphat và vitamin được loại bỏ khỏi nguồn protein. Axit amin được sản xuất bằng quá trình lên men nấm bao gồm glutamin, xystein, metionin, valin, leuxin, isoleuxin và một số axit amin khác, và có thể được sử dụng làm nguồn nitơ trong bước lên men vi khuẩn (b). Cụ thể, nồng độ cao glutamin là thành phần thiết yếu để sinh tổng hợp purin và có

thể đóng vai trò là yếu tố hoạt hóa chính để sản xuất hàm lượng cao IMP và axit glutamic. Ngoài ra, các ion vô cơ và vitamin được loại bỏ có thể có lợi cho sự sinh trưởng của tế bào vi khuẩn trong quá trình lên men. Thí nghiệm của sáng chế đã chỉ ra rằng, khi sản phẩm nhận được bằng cách lên men nấm được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng, thì sự sinh trưởng và phát triển của tế bào vi khuẩn trở nên nhanh hơn (Fig.4). Điều này còn chứng minh ưu điểm của quy trình sản xuất hai bước của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi khuẩn” dùng để chỉ vi khuẩn bất kỳ có thể lên men dịch lên men ngũ cốc thu được trong bước (a) để tạo thành dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic. Để sản xuất chất tạo vị tự nhiên theo sáng chế, chủng không biến đổi gen có thể được sử dụng. Vi khuẩn được sử dụng theo sáng chế có thể là vi khuẩn bất kỳ được biết đến trong công nghệ vi sinh vật có khả năng sản xuất IMP và axit glutamic bằng cách lên men. Cụ thể, khi dịch lên men IMP được sản xuất thì *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. hoặc *Escherichia* sp. có thể được sử dụng, và khi dịch lên men axit glutamic được sản xuất thì *Corynebacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Serratia* sp., *Candida* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp. hoặc *Enterobacter* sp. có thể được sử dụng. Theo sáng chế, tốt hơn là vi khuẩn được sử dụng có thể là *Corynebacterium* sp. Tốt nhất là *Corynebacterium ammoniagenes* có thể được sử dụng để sản xuất dịch lên men IMP, và *Corynebacterium glutamicum* có thể được sử dụng để sản xuất dịch lên men axit glutamic. Ngoài ra, đối với vi khuẩn, các vi khuẩn khác nhau được mô tả trong các tài liệu sáng chế trước đó và có khả năng sản xuất IMP và axit glutamic có thể được sử dụng. Cụ thể, dịch lên men IMP có thể được sản xuất bởi *Bacillus* sp. hoặc *Escherichia* sp. được mô tả trong bản công bố trước khi đăng ký bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-2007-000507 (tương ứng với Công bố đơn quốc tế số WO 2005-095627), và dịch lên men axit glutamic có thể được sản xuất bằng cách sử dụng *Enterobacter* sp. hoặc *Klebsiella* sp. được mô tả trong bản công bố trước khi đăng ký bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-2000-0029174 (tương ứng với Bằng sáng chế tại Hoa Kỳ số 7247459), nhưng không bị giới hạn bởi các chủng vi khuẩn nêu trên.

Theo thí nghiệm của sáng chế, để sản xuất dịch lên men IMP, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 (KCCM-10226) được mô tả trong Đơn đăng ký bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-0397321 (tương ứng với Công bố đơn quốc tế số WO2002-

051984) đã được sử dụng và để sản xuất dịch lên men axit glutamic, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) CJ971010 (KFCC 11039) được mô tả trong Đơn đăng kí bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-0264740 đã được sử dụng.

Dịch lên men thu được bằng cách lên men vi khuẩn trong bước (b) có hàm lượng chất rắn khoảng 150g/L. Đặc trưng của sáng chế là dịch lên men IMP và/hoặc dịch lên axit glutamic thu được nhờ lên men bằng vi khuẩn được sử dụng trong quy trình sản xuất chất tạo vị tự nhiên mà không cần bổ sung chất phụ gia vào đó, dịch lên men chứa một lượng lớn IMP và axit glutamic vốn là các thành phần mong muốn.

Do đó, chất rắn trong dịch lên men IMP được sản xuất bởi bước lên men thứ nhất nhờ nấm và bước lên men thứ hai nhờ vi khuẩn tốt nhất là có hàm lượng IMP bằng 30% trở lên, và tốt hơn nữa bằng 50% trở lên, nhưng không bị giới hạn bởi hàm lượng như vậy. Theo đó, nồng độ IMP trong dịch lên men IMP tốt nhất là từ 50g/L đến 150g/L, và tốt hơn nữa là từ 70g/L đến 130g/L.

Hơn nữa, bởi vì sản phẩm được sản xuất bởi bước lên men thứ nhất do nấm chứa axit amin, nên axit glutamic có thể được thu nhận với nồng độ cao và năng suất cao so với IMP. Chất rắn trong dịch lên men axit glutamic được sản xuất tốt nhất là có thể có hàm lượng axit glutamic bằng 50% trở lên, và tốt hơn nữa là bằng 60% trở lên, nhưng không bị giới hạn bởi hàm lượng đó. Do đó, nồng độ axit glutamic trong dịch lên men axit glutamic tốt nhất là từ 75g/L đến 150g/L, và tốt hơn nữa là từ 90g/L đến 130g/L.

Do dịch lên men có hàm lượng cao IMP và axit glutamic như được mô tả ở trên, nên khi dịch lên men được sấy khô thành dạng bột thì nó có thể được bổ sung một cách phù hợp vào thực phẩm.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất tạo vị” dùng để chỉ hợp chất được bổ sung để cải thiện hương vị của thực phẩm. Chất tạo vị có thể được phân loại theo thành phần của nó thành nhiều chất tạo vị khác nhau. Một số ví dụ cụ thể về chất tạo vị như chất tạo vị trung tính, chất tạo vị thịt bò tự nhiên, chất tạo vị thịt gà, chất tạo vị thịt lợn, chất tạo vị kokumi. Từng chất tạo vị có thể được sản xuất bằng cách sử dụng dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic được tạo thành bởi quy trình lên men hai bước theo sáng chế. Trong số đó, thuật ngữ “chất tạo vị trung tính” dùng để chỉ mùi vị

nhẹ và dễ chịu bằng cách tối ưu hóa vị umami và giảm thiểu các vị khác. Cụ thể, một số loại dầu như dầu hạt cải và dầu hạt nho được cho là có vị trung tính.

Bởi vì dịch lên men theo sáng chế có đặc trưng là nó được sử dụng trong quy trình sản xuất chất tạo vị tự nhiên mà không cần bổ sung bất kì chất phụ gia nào và không cần trải qua bất kì quá trình xử lý hóa học bổ sung nào để tinh chế, mọi thành phần môi trường đều là nguyên liệu dạng thực phẩm để dịch lên men được đưa trực tiếp vào thực phẩm, cụ thể là thực phẩm chế biến. Như vậy, mọi thành phần môi trường được thêm vào trong suốt quá trình lên men tốt nhất là nguyên liệu dạng thực phẩm. Theo thí nghiệm của sáng chế, để sử dụng nguyên liệu dạng thực phẩm làm thành phần môi trường, thì β -alanin đã được thay thế bằng canxi pantotenat (CAPA), và thí nghiệm đã chỉ ra rằng dịch lên men IMP có IMP với nồng độ bằng 70g/L trở lên có thể được sản xuất. Do vậy, tốt nhất là môi trường dùng cho lên men vi khuẩn theo sáng chế có thể chứa CAPA.

Từng dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic có thể được sản xuất bởi quy trình lên men hai bước bao gồm bước (a) và bước (b), và dịch lên men được sản xuất cuối cùng có thể trải qua bước thứ ba cho phản ứng và có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất các chất tạo vị khác nhau. Dựa vào dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic, các chất tạo vị tự nhiên khác nhau, cụ thể là chất tạo vị trung tính, chất tạo vị thịt bò tự nhiên, chất tạo vị thịt gà, chất tạo vị thịt lợn, chất tạo vị kokumi và nhiều chất tạo vị khác có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các nguyên liệu thô khác nhau, hoặc hơi thay đổi thành phần môi trường, hoặc kiểm soát các điều kiện của quy trình bao gồm nhiệt độ, áp suất và thời gian, trong quá trình phối trộn các dịch lên men, hoặc phản ứng hoặc quá trình thẩm tách bằng điện được làm rõ dưới đây. Trong số các chất tạo vị tự nhiên được sản xuất, chất tạo vị phù hợp cho mục đích của từng thực phẩm có thể được bổ sung vào thực phẩm để tạo ra mùi vị tối ưu.

Bước (c) là bước thẩm tách bằng điện dịch lên men IMP để có đặc tính vật lý phù hợp với các chất tạo vị trung tính. Vì dịch lên men IMP có chứa axit sunfuric, amoniac, và nhiều ion kim loại khác nhau như Mg và Mn do quá trình lên men, nên dịch lên men IMP có mùi vị lạ không phù hợp với chất tạo vị trung tính để tạo ra vị ngon. Do đó, bước thẩm tách bằng điện loại bỏ mùi vị lạ để loại bỏ mùi vị khó chịu hoặc vị đắng ra khỏi chất tạo vị trung tính và cho phép chất tạo vị trung tính có vị ngon hơn và nhẹ hơn và có đặc tính vật lý phù hợp cho chất tạo vị trung tính. Ngoài ra, bước

thẩm tách bằng điện cũng có thể cho phép dịch lên men axit glutamic có mùi vị lạ tương đối ít hơn so với dịch lên men IMP để có vị ngon hơn.

Theo thí nghiệm của sáng chế, chất tạo vị trung tính được sản xuất bằng cách sử dụng quá trình thẩm tách bằng điện, và các thuộc tính cảm quan của chất tạo vị được sản xuất có trải qua thẩm tách bằng điện được so sánh với chất tạo vị được sản xuất không trải qua thẩm tách bằng điện. Kết quả chỉ ra rằng cường độ vị kim loại, vị đắng, mùi vị khó chịu và độ tối màu của chất tạo vị được sản xuất có trải qua thẩm tách bằng điện giảm xuống, và do đó chất tạo vị có vị ngon, mùi thơm và chất lượng tổng thể cao hơn (Fig.5).

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thẩm tách bằng điện (ED)” dùng để chỉ quá trình tách thành phần ion ra khỏi dung dịch. Cơ sở khoa học của nó dựa vào nguyên tắc vận chuyển chất, trong đó thành phần ion trong dung dịch được vận chuyển chọn lọc qua màng nhựa trong đổi cation và màng nhựa trao đổi anion nhờ dòng điện trong điện trường. Quá trình lọc qua màng được sử dụng nhiều nhất là quá trình thẩm thấu ngược và siêu lọc. Vì quá trình thẩm tách bằng điện không phải là quá trình xử lý hóa học, nên nó có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất chất tạo vị tự nhiên theo mục tiêu của sáng chế. Theo mục tiêu của sáng chế, các ion trong dịch lên men, cụ thể là các ion kim loại, nhất là các cation và anion hóa trị một và hóa trị hai có thể được loại bỏ nhờ quá trình thẩm tách bằng điện, từ đó loại bỏ mùi lạ.

Quá trình xử lý bằng cacbon hoạt tính là quá trình tốt nhất để loại bỏ mùi vị lạ thông qua việc khử màu và khử mùi. Tuy nhiên, việc xử lý bằng cacbon hoạt tính có nhược điểm là cacbon hoạt tính sẽ khử màu và khử mùi thông qua sự hấp thụ vật lý mà công nghệ lọc hết các thành phần ion. Do đó, theo sáng chế, các chất tạo vị trung tính tự nhiên có vị ngon và thơm hơn có thể được sản xuất nhờ quá trình thẩm tách bằng điện, từ đó loại bỏ mùi vị lạ.

Trong khi đó, bước (c) còn có thể bao gồm bước xử lý dịch lên men bằng cacbon hoạt tính trước quá trình thẩm tách bằng điện. Ngoài ra, quá trình thẩm tách bằng điện có thể được thực hiện sau khi li tâm hoặc lọc dịch lên men đã được xử lý bằng cacbon hoạt tính. Sau khi dịch lên men được xử lý bằng cacbon hoạt tính, nó có thể tiếp tục được xử lý bằng đất tảo cát (diatomit) dưới dạng yếu tố trợ lọc. Hơn nữa, trước khi dịch lên men được xử lý bằng than hoạt tính, nó có thể phải trải qua quá trình

tiền xử lí bằng nhiệt để ly giải tế bào để làm tăng năng suất của quá trình lọc được thực hiện sau đó. Quá trình gia nhiệt tốt nhất là được thực hiện ở 70-90°C, và thời gian gia nhiệt nên kéo dài 15 phút hoặc lâu hơn, và tốt nhất là 15-60 phút.

Bước (d) là bước phối trộn dịch lên men axit glutamic và dịch lên men IMP thu được từ bước trước đó để tạo thành chất tạo vị trung tính tự nhiên. Ngoài ra, bước (d) còn có thể bao gồm bước tiếp tục phối trộn dịch lên men đã phối trộn với dịch lên men ngũ cốc.

Trong bước (d), chất tạo vị trung tính tự nhiên cuối cùng có thể được tạo thành bằng cách phối trộn dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic thông qua phương pháp sản xuất của sáng chế. Ở đây, tỉ lệ phối trộn dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic nên từ 0,2:1 đến 5:1, tốt hơn là từ 0,5:1 đến 2:1, và tốt nhất là 1:1, nhưng tỉ lệ phối trộn không bị giới hạn ở đó. Hơn nữa, dịch lên men được phối trộn còn có thể được phối trộn với dịch lên men ngũ cốc.

Bước phối trộn của sáng chế còn có thể bao gồm bước cô đặc dịch lên men và sấy khô để tạo thành dạng bột. Bước sấy dịch lên men thành dạng bột có thể được thực hiện trước hoặc sau khi phối trộn dịch lên men, và tốt nhất là có thể được thực hiện trước khi phối trộn dịch lên men. Quá trình làm khô tốt nhất là có thể được thực hiện bằng cách sấy phun hoặc sấy chân không. Dịch lên men cuối cùng có thể được tạo thành dạng bột hoặc bột nhão phù hợp để bổ sung vào thực phẩm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế còn cung cấp thành phần thực phẩm có chất tạo vị trung tính tự nhiên.

Chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất bởi phương pháp của sáng chế có vị ngon và mùi thơm nhẹ, và do đó có thể được bổ sung vào thực phẩm phù hợp để tối ưu mùi vị của thực phẩm và cũng có thể được áp dụng cho thực phẩm động vật. Cụ thể, chất tạo vị trung tính tự nhiên có thể được bổ sung vào gia vị đồ ăn nhẹ, hỗn hợp bột súp, chất tạo vị thương phẩm, nước xốt và các sản phẩm tương tự để tạo ra vị ngon.

Chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất theo phương pháp của sáng chế được sản xuất từ các nguyên liệu thô tự nhiên nên an toàn cho người sử dụng, và có

thể được bổ sung vào thực phẩm để tạo mùi vị thơm ngon từ đó cải thiện hương vị của thực phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn cùng với các ví dụ kèm theo. Tuy nhiên, phần này chỉ nhằm mục đích làm rõ sáng chế để những người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực có thể hiểu được mà không có xu hướng giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Lên men nguồn protein thực vật bằng nấm

Đối với quá trình lên men thứ nhất nhờ nấm, cơ chất chứa nguyên liệu ngũ cốc như đậu tương, ngô, gạo hoặc lúa mì được dùng để nuôi cấy chủng nấm *Aspergillus* sp. ở nhiệt độ 20-35°C trong 24-72 giờ, từ đó chuẩn bị dịch nuôi cấy nấm chứa proteaza nồng độ cao. Tiếp đó, nguồn protein thực vật như đậu tương, ngô, gạo hoặc lúa mì được trộn với nước đến nồng độ 25-35% và được khử trùng, và dịch nuôi cấy nấm chứa proteaza nồng độ cao được chuẩn bị ở trên được bổ sung vào nguồn protein thực vật khử trùng trong trạng thái không có muối để thủy phân nguồn protein thực vật. Dịch nuôi cấy nấm được bổ sung theo tỉ lệ 10-100% so với dịch chứa cơ chất khử trùng, và cơ chất được phân giải ở 40-50°C trong 48-96 giờ để tạo thành sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc.

Cụ thể, như được mô tả trong Đơn đăng kí bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-1191010 (tương ứng với Công bố đơn quốc tế số WO 2011-046249), *Aspergillus sojae* CJCC_080124P (KCCM11026P) được nuôi cấy trong bình và nuôi cấy nhân giống mở rộng, sau đó dịch nuôi cấy nấm đã được sử dụng để thủy phân cơ chất đậu tương khử

chất béo và gluten lúa mì, nhờ đó nhận được sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc. Cụ thể hơn, 200ml môi trường nuôi cấy sơ cấp được rót vào bình 1 lít rồi được khử trùng, tiếp đó 200ml dịch tế bào nấm được cấy truyền vào bình để đạt được mật độ $1,7 \times 10^{10}$ tế bào nấm/400ml và được nuôi khuấy 100 vòng/phút ở 30°C trong 7 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy thứ cấp được bơm vào thùng lên men 250 lít và được khử trùng, 600ml dịch nuôi cấy sơ cấp (sau khi đã lên men) được cấy truyền vào đó và được nuôi khuấy 70 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy chính được bơm vào bồn 5 tấn rồi được gia nhiệt 90°C trong 30 phút, sau đó môi trường được chuyển sang bồn lên men 8 tấn, và được bổ sung 100 lít nước và 2 lít chất khử bọt. Tiếp đó 144 lít dịch nuôi cấy thứ cấp được cấy truyền vào bồn nuôi cấy chính, và nấm được nuôi khuấy 700 vòng/phút ở 30°C trong 48 giờ, nhờ đó tạo ra dịch nuôi cấy nấm. Cuối cùng, nguyên liệu thô cho thủy phân cơ chất được bơm vào bồn chuẩn bị 5 tấn và được gia nhiệt đến 55°C trong 1 giờ rồi sau đó được chuyển sang bồn lên men 20 tấn, bổ sung vào đó 100 lít nước và 2 lít chất khử bọt, sau đó được khử trùng. Tiếp theo, 5760 lít dịch nuôi cấy nấm được bơm sang bồn thủy phân cơ chất và được nuôi khuấy 30 vòng/phút ở 45°C trong 96 giờ, nhờ đó tạo ra sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc. Thành phần môi trường được sử dụng trong sản xuất sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc được trình bày trên các bảng 1-4 dưới đây.

Bảng 1. Môi trường sơ cấp lên men nấm

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucoza	g	6	3
KH ₂ PO ₄	g	6	3
Cao nấm men	g	6	3
Nước	ml	182	

Bảng 2. Môi trường thứ cấp lên men nấm

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucoza	kg	1,44	1

KH ₂ PO ₄	kg	1,44	1
Cao nấm men	kg	1,44	1
Nước	kg	138,6	

Bảng 3. Môi trường nuôi cấy chính lên men nấm

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Đậu tương khử chất béo	kg	103,68	1,9
KH ₂ PO ₄	kg	57,6	1
Nước	kg	5352	

Bảng 4. Nguyên liệu thô cho thủy phân cơ chất

Nguyên liệu thô	Đơn vị tính	Số lượng
Gluten lúa mì	kg	2650
Nước	lít	7500

Sản phẩm thủy phân protein ngũ cốc được sản xuất như mô tả ở trên được lọc qua bộ lọc áp lực để loại bỏ tế bào nấm, nhờ đó thu được dịch lên men ngũ cốc có hàm lượng nitơ tổng số bằng 2% (w/v: khối lượng/thể tích) trở lên và độ thủy phân bằng 50% trở lên. Trong khi đó, dịch lên men ngũ cốc được tạo thành là môi trường để lên men vi khuẩn.

Ví dụ 2: Lên men vi khuẩn

Để chuẩn bị dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic bằng cách sử dụng dịch lên men ngũ cốc, nguồn cacbon như glucoza hoặc fructoza, muối khoáng như Fe, Mg, Mn và Zn, và vitamin được bổ sung vào dịch lên men ngũ cốc được tạo thành trong ví dụ 1, sau đó khử trùng, theo đó thu được môi trường để lên men vi khuẩn. Môi trường để sản xuất dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic được chuẩn

bị, và đối với mỗi dịch lên men, môi trường để nuôi cấy trong bình (nuôi cấy sơ cấp), nuôi cấy nhân giống mở rộng (nuôi cấy thứ cấp) và nuôi cấy chính được chuẩn bị.

2-1: Sản xuất dịch lên men IMP

Bằng cách sử dụng *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 (KCCM-10226) được mô tả trong Đơn đăng ký bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-0397321 (tương ứng với Công bố quốc tế số WO 2002-051984), dịch lên men IMP có IMP với nồng độ bằng 70g/L trở lên đã được tạo thành.

Cụ thể, 50ml môi trường nuôi cấy sơ cấp được điều chỉnh đến độ pH là 7,2 bằng cách sử dụng NaOH được rót vào bình 500ml và được khử trùng ở 121°C trong 15 phút, sau đó chủng vi khuẩn được cấy truyền vào môi trường và được nuôi khuấy 200 vòng/phút ở 32°C trong 22-28 giờ. Tiếp đó, 2,1 lít môi trường thứ cấp được rót vào bình 5 lít, được khử trùng và làm mát rồi được cấy truyền 300ml dịch nuôi cấy sơ cấp, và được nuôi cấy trong 2 lít không khí ở 32°C và 900 vòng/phút trong 27-30 giờ trong khi điều chỉnh độ pH đến 7,2. Tiếp theo, 8,5 lít môi trường nuôi cấy chính được rót vào bình 30 lít, được khử trùng và làm mát, sau đó cấy truyền vào đó 1500ml dịch nuôi cấy thứ cấp và được nuôi cấy trong 5 lít không khí ở 32°C và 400 vòng/phút trong 5-6 ngày trong khi điều chỉnh độ pH đến 7,2 và cung cấp đường bổ sung bao gồm hỗn hợp glucoza và fructoza vào bất kì thời điểm nào. Sau khi cung cấp đường bổ sung lần cuối, quá trình nuôi cấy tiếp tục được duy trì trong 7 giờ hoặc lâu hơn để đường được tiêu thụ hoàn toàn. Thành phần môi trường được sử dụng trong sản xuất dịch lên men IMP được trình bày trên các bảng 5-8 dưới đây.

Bảng 5. Môi trường nuôi cấy sơ cấp để sản xuất dịch lên men IMP

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucoza	g	10	1
Dịch lên men ngũ cốc	g	35	3,5
NaCl	g	2,5	0,25
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 6. Môi trường nuôi cấy thứ cấp để sản xuất dịch lên men IMP

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucosa	g	78,93	8
Dịch lên men ngũ cốc	g	21,43	2
H ₃ PO ₄ (85%)	g	2,14	0,21
KOH (85%)	g	1,77	0,18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g	1,43	0,14
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	7,14	0,71
L-xystein HCl	mg	28,6	
CAPA (canxi pantotenat)	mg	21,4	
Biotin	mg	0,09	
Tiamin	mg	7,1	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg	28,6	
MnSO ₄ ·7H ₂ O	mg	14,3	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg	14,3	
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 7. Môi trường nuôi cấy chính để sản xuất dịch lên men IMP

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
H ₃ PO ₄ (85%)	g	22,21	2,2
KOH (85%)	g	15,86	1,6
Dịch lên men ngũ cốc	g	7	0,7

CuSO ₄ .5H ₂ O	mg	12,2	
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	36,5	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	36,5	
MnSO ₄ .7H ₂ O	mg	109,6	
L-xystein HCl	mg	40,4	
CAPA(canxi pantotenat)	mg	34,7	
NCA (nicotinamit)	mg	34,9	
Biotin	mg	0,15	
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	182,6	
Tiamin	mg	23,5	
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	14,61	1,5
Glucoza	g	48,21	4,8
Fructoza	g	40,22	4
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 8. Đường bổ sung để sản xuất dịch lên men IMP

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucoza	g	358,97	35,9
Fructoza	g	299,58	30
NCA (nicotinamit)	mg	772	0,08
CAPA (canxi pantotenat)	mg	936,6	0,09

H ₃ PO ₄ (85%)	g	55,68	5,6
NaOH (100%)	g	13,5	1,4
Thể tích môi trường	ml	1000	

2-2: Sản xuất dịch lên men axit glutamic

Bằng cách sử dụng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) CJ971010 (KFCC 11039) được mô tả trong Đơn đăng kí bằng sáng chế tại Hàn Quốc số 10-0264740, dịch lên men axit glutamic có axit glutamic với nồng độ bằng 90g/L trở lên đã được tạo thành.

Cụ thể, 30ml môi trường nuôi cấy sơ cấp được rót vào bình 250ml và được khử trùng, sau đó chủng vi khuẩn được cấy truyền vào môi trường rồi được nuôi trong 5-8 giờ. Tiếp theo, 1,4 lít môi trường nuôi cấy thứ cấp được rót vào bình 5 lít, được khử trùng và làm mát, rồi tiếp đó 20ml dịch nuôi cấy sơ cấp được cấy truyền vào bình và được nuôi trong 20-28 giờ. Sau đó, 9,2 lít môi trường nuôi cấy chính được rót vào bình 30 lít, được khử trùng và làm mát, rồi sau đó 800ml dịch nuôi cấy thứ cấp được cấy truyền vào và được nuôi trong 36-45 giờ, trong quá trình nuôi đường bổ sung được cung cấp vào thời điểm bất kì.

Sau khi cung cấp đường bổ sung đợt cuối cùng, quá trình nuôi cấy tiếp tục được duy trì trong 7 giờ hoặc lâu hơn để đường được tiêu thụ hết. Thành phần của môi trường được sử dụng trong sản xuất dịch lên men axit glutamic được trình bày trên các bảng 9-12 dưới đây.

Bảng 9. Môi trường nuôi cấy sơ cấp để sản xuất dịch lên men axit glutamic

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Đường thô (98,5%)	g	20,3	2
Dịch lên men ngũ cốc	g	13	1,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	13,72	1,4
KH ₂ PO ₄	g	5,2	0,5

K ₂ HPO ₄	g	10,7	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0,5	0,05
d-biotin	mg	1,8	
Tiamin-HCl	mg	9	
CAPA (canxi pantotenat)	mg	9	
Niixinamit(nicotinamit)	mg	60	
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 10. Môi trường nuôi cấy thứ cấp để sản xuất dịch lên men axit glutamic

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucosa	g	81,79	8,2
Fructoza	g	23,14	2,3
H ₃ PO ₄ (85%)	g	2,73	0,27
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	1,03	0,1
Betain	g	0,14	0,01
DL-Meth (metaphetamin)	g	0,15	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	18,6	
MnSO ₄ .7H ₂ O	mg	18,6	
CuSO ₄ .5H ₂ O	mg	3,6	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	3,6	
Tiamin-HCl	mg	7,1	

Vitamin C(axitascorbic)	mg	7,1	
xucxinat	mg	1,1	
d-biotin	mg	17,4	
Vitamin B12(xianocobalamin)	mg	0,057	
Dịch lên men ngũ cốc	g	42,86	4,3
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 11. Môi trường nuôi cấy chính để sản xuất dịch lên men axit glutamic

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucosa	g	5,86	0,6
Fructoza	g	10,48	1
Đường thô	g	50	5
Betaine	g	0,97	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	3,69	0,4
K ₂ HPO ₄	g	9	0,9
H ₃ PO ₄ (85%)	g	3,1	0,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg	22,9	
MnSO ₄ .7H ₂ O	mg	22,9	
CuSO ₄ .5H ₂ O	mg	2,3	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	2,3	
CAPA (canxi pantotenat)	mg	2,9	

NCA (nicotinamit)	mg	2,9	
Biotin	mg	0,29	
CaCl ₂ .2H ₂ O	mg	71,4	
Tiamin-HCl	mg	0,4	
Vitamin C(axitascorbic)	mg	1,7	
Thể tích môi trường	ml	1000	

Bảng 12. Đường bổ sung để sản xuất dịch lên men axit glutamic

Thành phần môi trường	Đơn vị tính	Số lượng	%
Glucosa	g	192,3	19,2
Fructoza	g	54,33	5,4
Đường thô	g	147,33	14,7
Betaine	g	0,67	0,07
Dịch lên men ngũ cốc	g	4	0,4
CAPA (canxi pantotenat)	mg	15,87	
NCA (nicotinamit)	mg	15,87	
Thể tích môi trường	ml	1000	

Để sản xuất dịch lên men IMP bằng cách sử dụng môi trường dùng cho sản xuất dịch lên men IMP và sử dụng dịch lên men IMP làm chất tạo vị để bổ sung vào thực phẩm, một số thành phần môi trường nên được thay thế bằng nguyên liệu dạng thực phẩm để đáp ứng yêu cầu về phụ gia thực phẩm. Do đó, adenin và β -alanin cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào được thay thế bằng nguyên liệu dạng thực phẩm.

Trước hết, adenin được tạo thành bằng cách thủy phân AMP bằng axit để cắt liên kết β -N-glycosidic với ribosa để giải phóng adenin. Thực tế cho thấy rằng, khi quy trình nuôi cấy được thực hiện sử dụng adenin được sản xuất như mô tả ở trên thì dịch lên men IMP có IMP với nồng độ lên đến 70g/L trở lên có thể được tạo thành (Fig.2).

Tiếp đó, như kết quả đánh giá con đường chuyển hóa của *Corynebacterium ammoniagenes*, β -alanin được kì vọng là có thể được thay thế bằng canxi pantotenat (CAPA). Theo đó, quy trình nuôi cấy được thực hiện với việc sử dụng CAPA thay cho β -alanin, và kết quả là dịch lên men IMP có IMP với nồng độ 70g/L trở lên có thể được tạo thành (Fig.3).

Ví dụ 3: Đánh giá tốc độ sinh trưởng tế bào trong trường hợp sản phẩm lên men nấm được sử dụng trong lên men vi khuẩn

Để khẳng định ưu điểm của trường hợp mà trong đó bước lên men thứ nhất lên men nấm và bước lên men thứ hai lên men vi khuẩn được thực hiện liên tiếp, tốc độ tăng trưởng và mức độ phát triển của tế bào vi khuẩn trong trường hợp protein thực vật được phân giải bởi bước lên men nấm được bổ sung làm nguồn dinh dưỡng và trong trường hợp protein thực vật không được bổ sung đã được đánh giá.

Kết quả là, như được minh họa trên Fig.4, trong trường hợp protein thực vật được phân giải bởi bước lên men nấm được bổ sung làm nguồn dinh dưỡng thì tế bào vi khuẩn phát triển với tốc độ cao và số lượng lớn hơn so với trường hợp protein thực vật không được bổ sung (Fig.4).

Ví dụ 4: Đánh giá sự thay đổi vị đặc trưng của dịch lên men axit glutamic theo nguồn cacbon khác nhau

Nguồn cacbon có thể được sử dụng trong lên men axit glutamic bao gồm glucoza, fructoza, rỉ đường mía, đường thô, v.v.. Mặc dù một số thành phần khác thay đổi tùy thuộc vào nguồn cacbon, nhưng nồng độ axit glutamic của dịch lên men thu được phụ thuộc không đáng kể vào nguồn cacbon. Tuy nhiên, vị của dịch lên men thay đổi đáng kể tùy thuộc vào nguồn cacbon, và để phát triển vị trung tính thì dịch lên men thu được tốt nhất là có vị ngon. Rỉ đường mía là thành phần môi trường rất tốt đối với quá trình lên men vi sinh do có chứa các ion vô cơ khác nhau, nhưng có hạn chế là giá trị sử dụng làm chất tạo vị trung tính thấp, bởi vì màu của bản thân môi trường quá sẫm và vị gây ra bởi sự caramen hóa vẫn còn trong dịch nuôi cấy thu được.

Theo đó, đường thô được sử dụng thay thế rỉ đường mía trong quy trình tạo thành dịch lên men axit glutamic để sản xuất chất tạo vị trung tính, và sự thay đổi vị đặc trưng của dịch nuôi cấy đã được đánh giá. Ở đây, trong khi rỉ đường mía được thay thế bằng đường thô, thì các ion vô cơ và vitamin chính có trong rỉ đường mía đã được bổ sung vào môi trường. Kết quả cho thấy rằng, khi rỉ đường mía được thay thế bằng đường thô thì mùi vị lạ được loại bỏ, và do đó mùi đặc trưng phù hợp cho sản xuất chất tạo vị tự nhiên xuất hiện (bảng 13). Ngoài ra, dịch lên men axit glutamic được sản xuất bằng cách sử dụng đường thô cũng chứa nồng độ cao (96g/L trở lên) axit glutamic, nồng độ phù hợp để sản xuất chất tạo vị tự nhiên.

Bảng 13. Sự thay đổi vị đặc trưng của dịch nuôi cấy theo công thức tỉ lệ của rỉ đường mía và đường thô

	Rỉ đường mía (100%)	Rỉ đường mía + đường thô (5:5)	Đường thô (100%)
Vị trung tính	-	+	++
Vị lạ	+	-	--

Ví dụ 5: Sản xuất chất tạo vị trung tính

Bằng cách sử dụng dịch lên men axit glutamic và dịch lên men IMP được tạo thành trong ví dụ 2, chất tạo vị trung tính đã được sản xuất.

Cụ thể, để tăng năng suất của quá trình lọc được thực hiện sau đó, mỗi dịch lên men được gia nhiệt ở 70-90°C trong 15 phút hoặc lâu hơn để ly giải tế bào. Quá trình tiền xử lý này có thể làm tăng năng suất lọc đến 85% trở lên. Tiếp đó, để loại bỏ mùi và vị lạ ra khỏi dịch lên men axit glutamic và dịch lên men IMP, cacbon hoạt tính đã được bổ sung với hàm lượng 1-3% (w/v: khối lượng/thể tích) tùy thuộc vào thể tích dịch lên men, sau đó dịch lên men được xử lý với cacbon hoạt tính ở 50-70°C trong 2-24 giờ. Sau khi xử lý với cacbon hoạt tính, 1-3% (w/v) đất tảo cát (diatomit) được bổ sung vào dịch lên men dưới dạng yếu tố trợ lọc, rồi tiếp đó dịch lên men được lọc nhờ bộ lọc áp lực.

Dịch lọc được xử lý với cacbon hoạt tính tiếp tục trải qua quá trình thẩm tách bằng điện để loại bỏ các ion hóa trị một và hóa trị hai, bao gồm các ion của Ca, Fe, K, Mg và NH_4 , từ đó loại bỏ mùi vị lạ có nguồn gốc từ ion amoniac và ion kim loại, qua đó tạo thành chất tạo vị trung tính.

Khi dịch lên men trải qua quá trình thẩm tách bằng điện ở cường độ dòng chảy 5-20 lít/giờ.m², các ion hóa trị một và hóa trị hai, như các ion Ca, Fe, K, Mg, và Mn được làm giảm 30-60%. Hàm lượng của các thành phần trong dịch lên men trước và sau khi thực hiện quá trình thẩm tách bằng điện được minh họa trên bảng 14 dưới đây. Như minh họa trên bảng 14, hàm lượng của các ion vô cơ trong dịch lên men giảm sau khi thực hiện quá trình thẩm tách bằng điện, trong khi chất tạo vị lên men có vị ngon hơn và nhẹ hơn.

Cuối cùng, muối tinh luyện và mantodextrin được bổ sung vào dịch lọc thu được bằng quá trình nuôi cấy và lọc như được mô tả ở trên, và hỗn hợp được tạo thành dạng bột nhờ sấy phun, qua đó sản xuất chất tạo vị tự nhiên theo sáng chế.

Bảng 14

	IMP (g/lít)	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn	Cl-	SO ₄	PO ₄	NH ₄
Trước khi thẩm tách bằng điện	69,6	87	<0,1	1	98	77	0,8	251	<0,1	64	1100	13700	6230
Sau khi thẩm tách bằng điện	63,7	35	<0,1	0,3	73	59	0,2	234	<0,1	<0,1	390	5720	3350

Ví dụ 6: Đánh giá các thuộc tính cảm quan gây ra bởi quá trình thẩm tách bằng điện

Để kiểm tra xem vị của chất tạo vị trung tính theo sáng chế được sản xuất như mô tả ở trên, việc đánh giá các thuộc tính cảm quan đã được thực hiện.

Mỗi mẫu mà trong đó các ion vô cơ được loại bỏ nhờ thẩm tách bằng điện và mẫu không trải qua thẩm tách bằng điện được tạo thành dạng bột, và sau đó các thuộc tính cảm quan của các mẫu được đánh giá như trên bảng 14. Kết quả được đánh giá bởi những chuyên gia được đào tạo chuyên nghiệp để họ dễ dàng nhận ra các thuộc tính cảm quan, và kết quả trên bảng 14 có được từ việc đánh giá thuộc tính cảm quan và cường độ của các mẫu có cùng nồng độ.

Kết quả là, như được minh họa trên Fig.5, cường độ vị umami không khác biệt đáng kể ở mẫu trước và sau khi thẩm tách bằng điện, nhưng trong trường hợp dịch lên men trước khi trải qua thẩm tách bằng điện thì các yếu tố tiêu cực như vị kim loại, vị đắng, vị khó chịu và màu tối đều có cường độ cao, và vị ngon và mức độ hài lòng đối với dịch lên men thấp. Tuy nhiên, trong trường hợp dịch lên men trải qua quá trình thẩm tách bằng điện, thì các yếu tố tiêu cực như vị kim loại, vị đắng, vị khó chịu và màu tối đều có cường độ thấp, và do đó mức độ hài lòng về vị và màu sắc cao và độ sạch và mức độ hài lòng tổng thể cao. Theo đó, có thể thấy rằng khi quá trình thẩm tách bằng điện được thực hiện, thì chất tạo vị trung tính có thể được sản xuất với vị ngon hơn và chất lượng tổng thể được cải thiện so với chất tạo vị trung tính trước khi trải qua quá trình thẩm tách bằng điện.

Ví dụ 7: So sánh các thuộc tính cảm quan với cao nấm men

Để đánh giá hiệu quả tạo vị của chất tạo vị trung tính theo sáng chế, các thuộc tính cảm quan của chất tạo vị trung tính đã được so sánh với các thuộc tính cảm quan của cao nấm men vốn là một trong những chất tạo vị tự nhiên được sử dụng rộng rãi và đa dạng nhất hiện nay.

Trong một số trường hợp cao nấm men được sử dụng thuận lợi trong thực phẩm chế biến, nhưng trong đa số trường hợp việc sử dụng nó trong thực phẩm chế biến bị hạn chế vì vị đặc trưng của nó làm giảm sự cân bằng vị của thực phẩm chế biến do mùi vị lạ có nguồn gốc từ mùi vị lên men đặc trưng (được gọi là hương vị cao nấm men).

Do vậy, mẫu thực phẩm đơn giản đã được phát triển với chất tạo vị được bổ sung vào là cao nấm men hoặc chất tạo vị trung tính của sáng chế, sau đó các thuộc tính cảm quan của chúng được đánh giá bởi nhóm gồm nhiều nhà nghiên cứu (n=45).

Kết quả là, như minh họa trên Fig.6, trong nhóm mà cao nấm men được sử dụng thì cường độ vị cao nấm men cao, mức độ hài lòng đối với cao nấm men thấp và xuất hiện xu hướng nhận biết cao nấm men qua mùi và vị lạ. Điều đó chỉ ra rằng mức độ hài lòng về vị tổng thể tương đối cao đối với chất tạo vị trung tính của sáng chế.

Kết quả gợi ý rằng mùi và vị lạ có nguồn gốc từ các ion vô cơ sẽ được loại bỏ có hiệu quả ra khỏi chất tạo vị trung tính của sáng chế, và như vậy chất tạo vị trung tính tạo ra vị tốt khi được sử dụng cho thực phẩm.

Ngoài ra, các thuộc tính cảm quan của chất tạo vị trung tính của sáng chế và cao nấm men đã được so sánh bởi 9 ban hội thẩm được đào tạo bằng cách sử dụng phân tích mô tả biến đổi định lượng. Cụ thể, ban hội thẩm được đào tạo trong 6 giờ, các thuộc tính cảm quan được đo lặp lại ba lần, và 6 loại mẫu được đồng thời cung cấp cho các ban hội thẩm và được đánh giá ngẫu nhiên. Tổng của 16 thuộc tính được đánh giá theo thang điểm 16 (0-15). 16 thuộc tính được đánh giá 6 thuộc tính 6 thuộc tính mùi thơm, 5 thuộc tính vị giác, 3 thuộc tính hương vị và 2 thuộc tính cảm giác miệng. Sau khi mỗi một mẫu được đánh giá, người đánh giá sử dụng cơm hoặc nước để làm sạch mùi vị trong miệng rồi mới tiếp tục đánh giá mẫu tiếp theo. 70ml của mỗi mẫu được đựng trong cốc sứ được cung cấp cho ban hội thẩm và phân tích thống kê (Mean, MANOVA, PCA) được thực hiện.

Kết quả là, trong trường hợp chất tạo vị tự nhiên của sáng chế, vị đường cháy, mùi chua và vị trà hải cầu Solomon (Solomon's seal: một loại cây thuộc chi *Polygonatum*) được cảm nhận mạnh mẽ so với cao nấm men, và do đó vị tự nhiên có mùi vị thơm ngon và vị chua. Ngoài ra, trong trường hợp chất tạo vị trung tính, vị khoai tây luộc hoặc mùi thơm được tạo thành từ thành phần môi trường không được cảm thấy, và mùi đậu tương luộc biểu hiện cho mùi lên men thấp hơn đáng kể so với cao nấm men. Ngoài ra, chất tạo vị trung tính tự nhiên của sáng chế có cường độ bao trùm miệng cao hơn đáng kể so với các chất tạo vị được sản xuất bởi các công ty khác, chỉ ra rằng chất tạo vị trung tính tự nhiên có thể dễ dàng biểu hiện cảm giác bao trùm miệng ngay cả khi nó được sử dụng với một lượng nhỏ. Cụ thể, với đặc điểm riêng của chất tạo vị trung tính theo sáng chế, trong mối liên hệ với axit glutamic thì cường độ umami có mối liên hệ rất cao và mùi hoặc vị ngũ cốc cháy (trà hải cầu Solomon) gia tăng, còn trong mối liên hệ với IMP thì cường độ umami tương tự như ở cao nấm men, mùi đường cháy mạnh mẽ và chất tạo vị trung tính có vị chua. Ngoài ra, có thể thấy rằng cao nấm men có mùi hoặc vị khoai tây luộc hoặc mùi đậu tương luộc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chất tạo vị trung tính tự nhiên bao gồm các bước:

(a) lên men nguồn protein thực vật bằng nấm *Aspergillus* sp. để thu nhận dịch lên men ngũ cốc;

(b) lên men dịch lên men ngũ cốc bằng vi khuẩn *Corynebacterium* sp. hoặc *Brevibacterium* sp. để thu nhận dịch lên men inozin-5'-monophosphat (IMP) và dịch lên men axit glutamic;

(c) thẩm tách bằng điện dịch lên men IMP; và

(d) trộn dịch lên men axit glutamic của bước (b) và dịch lên men IMP của bước (c).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước (d) còn bao gồm công đoạn phối trộn với dịch lên men ngũ cốc của bước (a).

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất tạo vị tự nhiên được sản xuất bằng cách chỉ sử dụng dịch lên men mà không bổ sung bất kì thành phần phụ gia nào.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất tạo vị tự nhiên được sản xuất bằng cách sử dụng dịch lên men mà không cần trải qua bất kì quá trình xử lý hóa học bổ sung nào.

5. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nguồn protein thực vật được lựa chọn từ một nhóm bao gồm đậu tương, ngô, gạo, lúa mì và gluten lúa mì.

6. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nấm *Aspergillus* sp. là *Aspergillus sojae*.

7. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn *Corynebacterium* sp. là *Corynebacterium ammoniagenes*.

8. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn *Corynebacterium* sp. là *Corynebacterium glutamicum*.

9. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic được phối trộn với tỉ lệ từ 0,2:1 đến 5:1.

10. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thành phần môi trường để lên men vi khuẩn trong sản xuất dịch lên men IMP hoặc dịch lên men axit glutamic bao gồm nguyên liệu dạng thực phẩm.

11. Phương pháp theo điểm 12, trong đó thành phần môi trường để lên men vi khuẩn bao gồm canxi pantotenat (CAPA).

12. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó môi trường để vi khuẩn lên men trong sản xuất dịch lên men IMP bao gồm glucoza, fructoza, magie sulfat, axit phosphoric, kali hydroxit và dịch lên men ngũ cốc.

13. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó môi trường để lên men vi khuẩn trong sản xuất dịch lên men axit glutamic bao gồm glucoza, fructoza, đường thô, betain, magie sulfat, kali phosphat và axit phosphoric.

14. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nguồn cacbon trong môi trường để lên men vi khuẩn trong sản xuất dịch lên men axit glutamic là đường thô.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ IMP trong dịch lên men IMP được sản xuất ở bước (b) là từ 50g/L đến 150g/L.

16. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hàm lượng IMP trong chất rắn trong dịch lên men IMP được sản xuất ở bước (b) lớn hơn hoặc bằng 30%.

17. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ axit glutamic trong dịch lên men axit glutamic được sản xuất ở bước (b) là từ 75g/L đến 150g/L.

18. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hàm lượng axit glutamic trong chất rắn trong dịch lên men axit glutamic được sản xuất ở bước (b) lớn hơn hoặc bằng 50%.

19. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thẩm tách bằng điện dịch lên men axit glutamic trong bước (c).

20. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch lên men IMP và dịch lên men axit glutamic bằng cacbon hoạt tính trước bước (c).

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước ly tâm hoặc lọc dịch lên men đã được xử lý bằng cacbon hoạt tính.

22. Phương pháp theo điểm 20, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước gia nhiệt dịch lên men ở nhiệt độ từ 70 đến 90°C trong 15 đến 60 phút để ly giải tế bào trước khi xử lý dịch lên men bằng cacbon hoạt tính.

23. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cô đặc dịch lên men và làm khô để tạo thành chế phẩm dạng bột trong bước (d).

24. Chất tạo vị trung tính tự nhiên được sản xuất bởi phương pháp theo điểm 1 hoặc 2.

25. Thực phẩm bao gồm chất tạo vị trung tính tự nhiên của điểm 24.

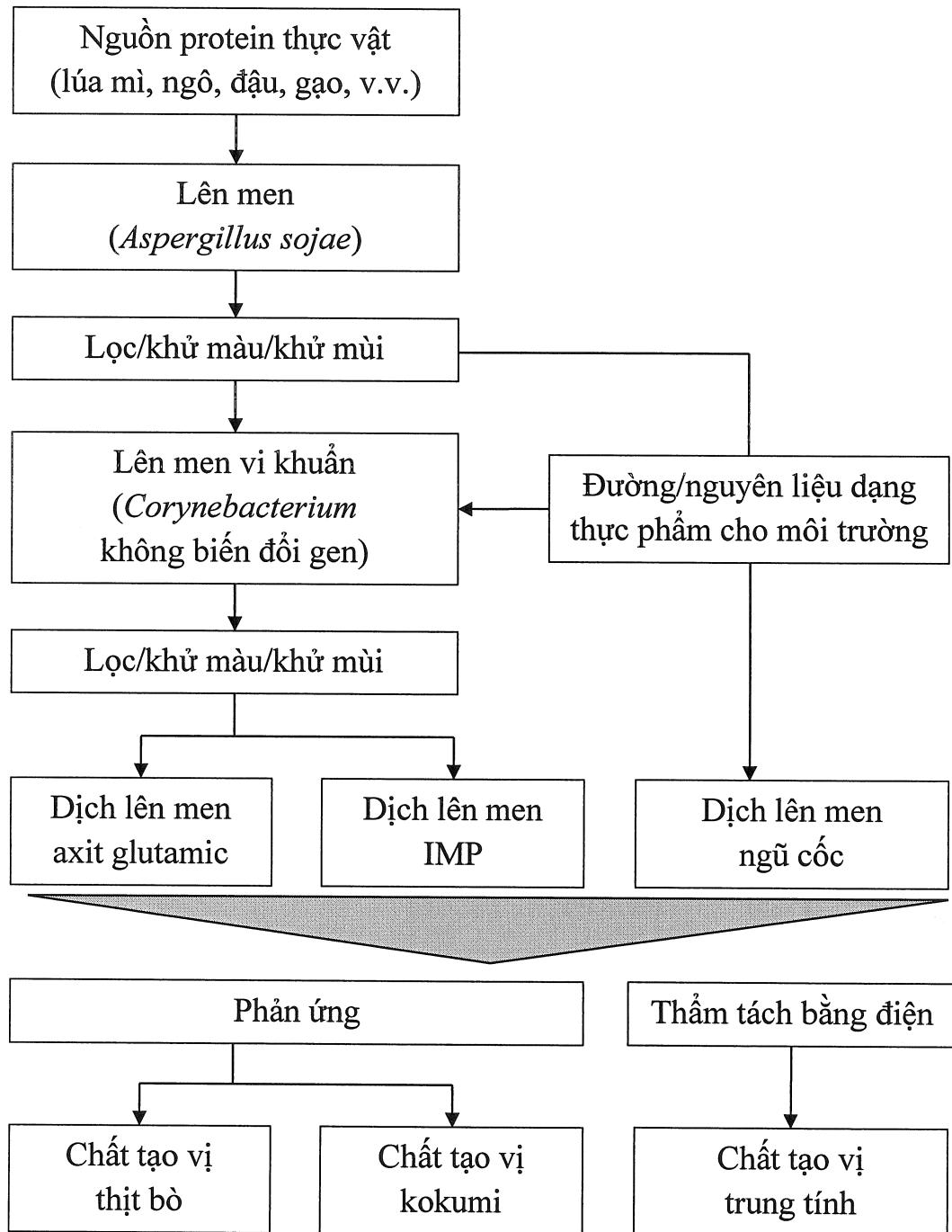


FIG.1

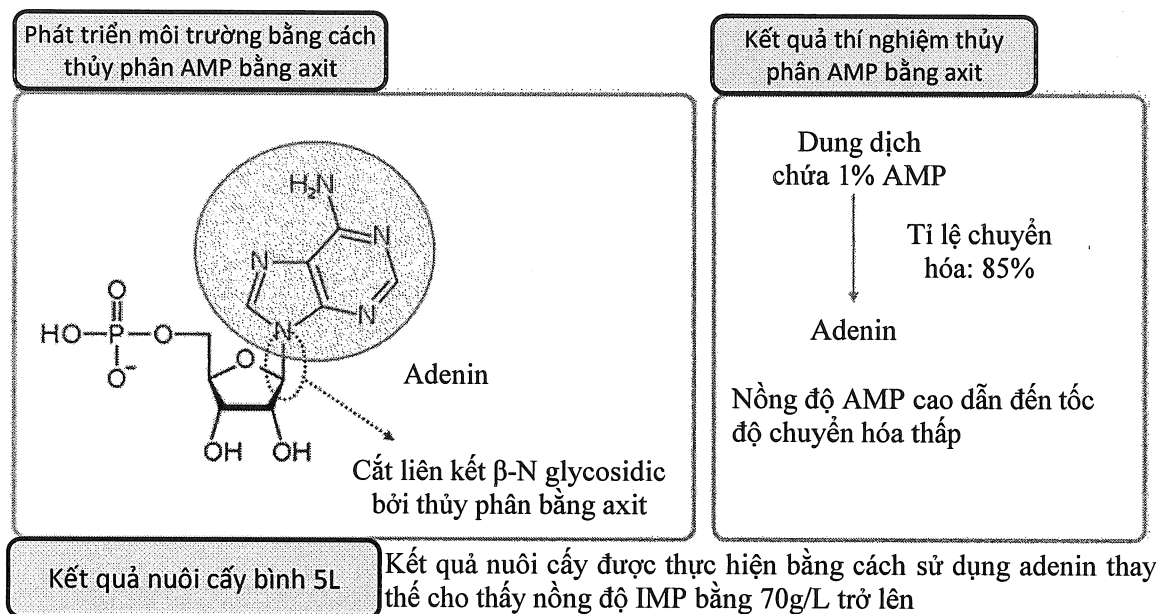


FIG.2

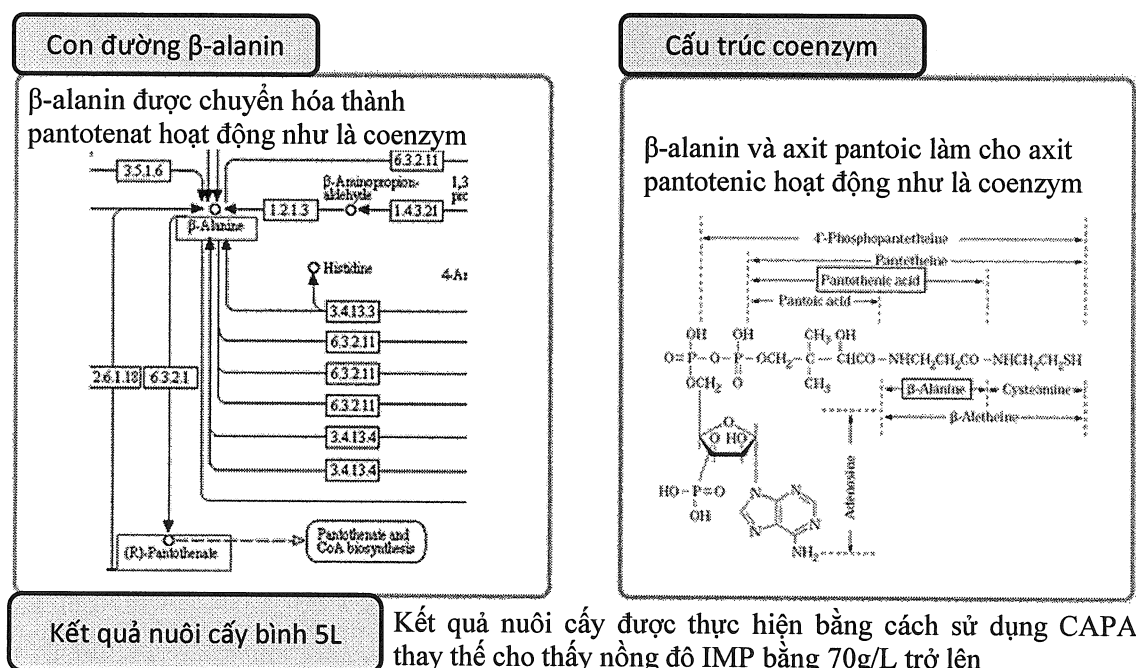


FIG.3

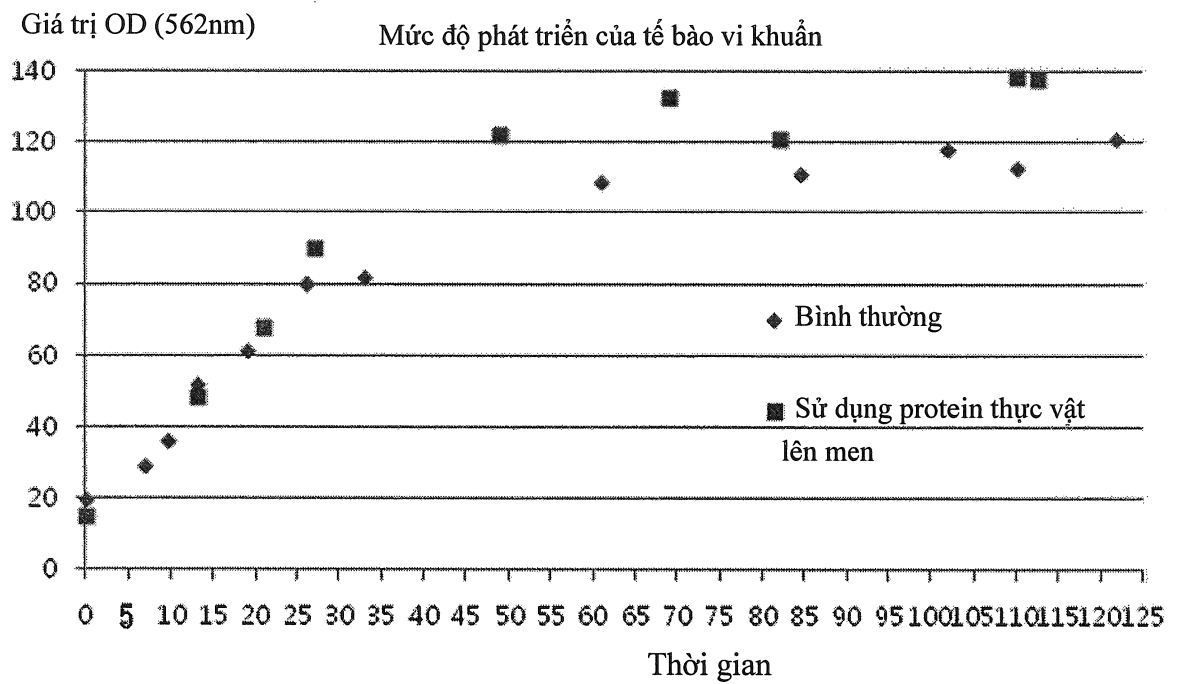


FIG.4

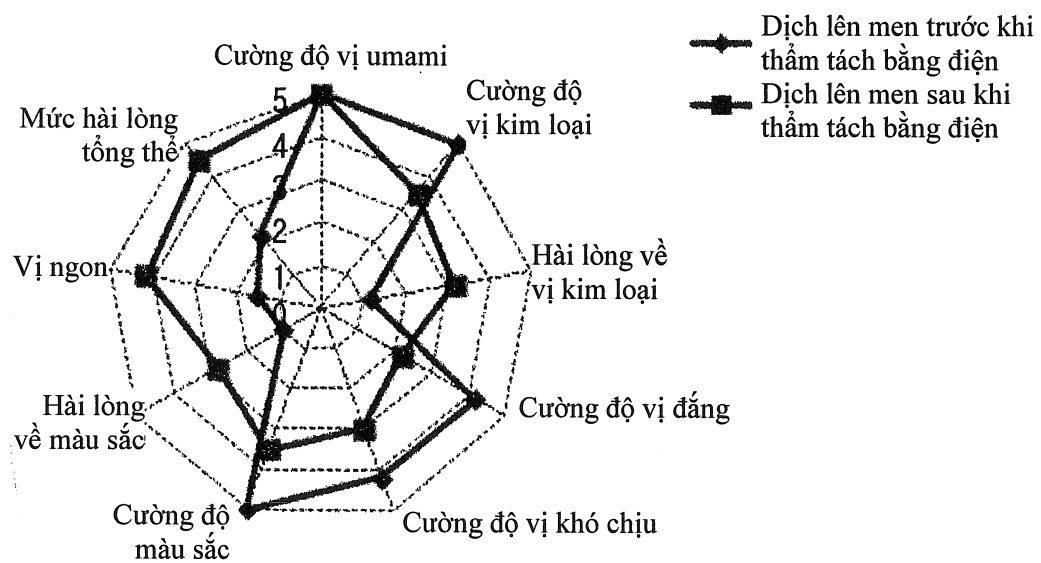


FIG.5

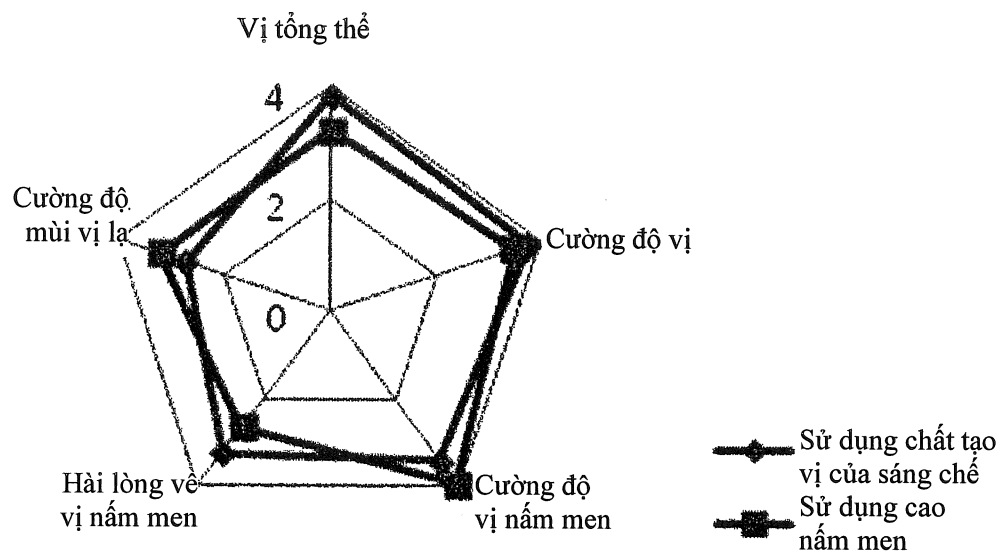


FIG.6