



(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)



1-0025855

(51)⁷ A23F 5/16; A23F 5/24

(13) B

(21) 1-2015-03328

(22) 20/03/2014

(86) PCT/EP2014/055627 20/03/2014

(87) WO 2014/147189 25/09/2014

(30) 13160489.4 21/03/2013 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/02/2016 335A

(73) NOVOZYMES A/S (DK)

Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark

(72) LYNGLLEV, Gitte Budolfson (DK); SCHOESLER, Susanne (DK).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT CÀ PHÊ RANG

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt cà phê rang bao gồm bước xử lý hạt cà phê thô bằng hơi nước, sau đó cho tiếp xúc với asparaginaza.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt cà phê rang bao gồm bước cho hạt cà phê thô tiếp xúc với asparaginaza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rõ là sự tạo ra acrylamit trong các sản phẩm thực phẩm được gia nhiệt có thể được làm giảm bằng cách xử lý làm giảm lượng asparagin trong các nguyên liệu thực phẩm, như bằng cách cho các nguyên liệu thực phẩm chịu tác động của enzym asparaginaza (xem, ví dụ, WO2004/026042).

Trong bã cà phê rang không được ủ, đã đo được nồng độ của acrylamit nằm trong khoảng từ 45 đến 374 ng/g (Andrzejewski D. et al. "Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamit by LC- MS/MS", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, No. 7, 2004, pp. 1996-2002).

Việc xử lý hạt cà phê bằng asparaginaza để làm giảm lượng acrylamit trong cà phê rang đã được bộc lộ (WO2004/037007; WO2008/151807; WO2013/005145).

Việc cải thiện chất lượng của hạt cà phê bằng cách xử lý hạt cà phê thô bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 135 đến 140°C đã được bộc lộ (US5,019,413).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự tạo ra acrylamit trong hạt cà phê rang được xử lý bằng asparaginaza, cụ thể là hạt cà phê Robusta, có thể được làm giảm thêm nữa nhờ việc xử lý hạt cà phê bằng hơi nước trước khi xử lý bằng asparaginaza.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt cà phê rang, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xử lý hạt cà phê Robusta thô bằng hơi nước;
- (b) cho hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước tiếp xúc với asparaginaza; và

(c) rang hạt cà phê thô đã được xử lý bằng asparaginaza.

Cụ thể, việc xử lý hạt cà phê thô bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 115°C, như khoảng 100°C hoặc 110°C, sau đó xử lý bằng asparaginaza và rang tạo ra lượng acrylamit thấp trong hạt cà phê rang so với hạt cà phê không được xử lý như vậy.

Theo phương án được ưu tiên, hạt cà phê Robusta thô được xử lý bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 120°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 105 đến 115°C.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hạt cà phê rang, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xử lý hạt cà phê thô bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 105 đến 115°C;
- (b) cho hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước tiếp xúc với asparaginaza; và
- (c) rang hạt cà phê thô đã được xử lý bằng asparaginaza.

Theo phương án được ưu tiên, hạt cà phê là hạt cà phê Robusta.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thường ghi nhận là có hai loại cà phê thương mại chủ yếu: hạt cà phê Arabica (từ cây *Coffea arabica*) và hạt cà phê Robusta (từ cây *Coffea canephora*).

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt cà phê rang, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xử lý hạt cà phê Robusta thô bằng hơi nước;
- (b) cho hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước tiếp xúc với asparaginaza; và
- (c) rang hạt cà phê thô đã được xử lý bằng asparaginaza.

Tốt hơn là, theo sáng chế, hạt cà phê Robusta là hạt cà phê từ cây *Coffea canephora*.

Theo phương án được ưu tiên của khía cạnh thứ nhất, hạt cà phê Robusta thô được xử lý bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 120°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 105 đến 115°C.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt cà phê rang, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xử lý hạt cà phê thô bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 105 đến 115°C;
- (b) cho hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước tiếp xúc với asparaginaza; và
- (c) rang hạt cà phê thô đã được xử lý bằng asparaginaza.

Theo phương án được ưu tiên của khía cạnh thứ hai, hạt cà phê là hạt cà phê Robusta.

Phương pháp theo cả hai khía cạnh của sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo phương án được ưu tiên, phương pháp này nhằm sản xuất hạt cà phê rang có lượng acrylamit giảm so với hạt cà phê rang mà không được xử lý bằng hơi nước và được cho tiếp xúc với asparaginaza sau đó.

Tốt hơn là, lượng acrylamit của hạt cà phê rang được làm giảm đi ít nhất 25%, tốt hơn nữa là giảm đi ít nhất 40%, thậm chí tốt hơn nữa là giảm đi ít nhất 50%, so với lượng acrylamit của hạt cà phê rang mà không được xử lý bằng hơi nước và được cho tiếp xúc với asparaginaza sau đó.

Theo phương án được ưu tiên khác, phương pháp này nhằm sản xuất hạt cà phê rang có lượng acrylamit giảm so với hạt cà phê rang thu được theo cách giống như vậy ngoại trừ là chúng không được cho tiếp xúc với asparaginaza.

Tốt hơn là, lượng acrylamit của hạt cà phê rang được làm giảm đi ít nhất 10%, tốt hơn nữa là giảm đi ít nhất 25%, như ít nhất 30%, ít nhất 35%, ít nhất 40%, ít nhất 45% hoặc ít nhất 50%, so với lượng acrylamit của hạt cà phê rang thu được theo cách giống như vậy ngoại trừ là chúng không được cho tiếp xúc với asparaginaza.

Theo phương án được ưu tiên khác, phương pháp này nhằm sản xuất hạt cà phê rang có lượng acrylamit giảm so với hạt cà phê rang thu được theo cách giống như vậy ngoại trừ việc chúng không được xử lý bằng hơi nước.

Tốt hơn là, lượng acrylamit của hạt cà phê rang được làm giảm đi ít nhất 10%, tốt hơn nữa là giảm đi ít nhất 25%, như ít nhất 30%, ít nhất 35%, ít nhất 40%, ít nhất 45% hoặc ít nhất 50%, so với lượng acrylamit của hạt cà phê rang thu được theo cách giống như vậy ngoại trừ việc chúng không được xử lý bằng hơi nước.

Hạt cà phê được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là hạt cà phê thô. Hạt cà phê thô có thể còn được gọi là hạt cà phê xanh hoặc hạt cà phê chưa được rang.

Trong phương pháp theo sáng chế, hạt cà phê thô được xử lý bằng hơi nước. Tốt hơn là, hạt cà phê thô được xử lý bằng hơi nước bão hòa.

Theo phương án được ưu tiên, trước hoặc trong bước (a), lượng nước của hạt cà phê được làm tăng đến mức nằm trong khoảng từ khoảng 30% khối lượng đến khoảng 45% khối lượng, như khoảng 35% khối lượng.

Tốt hơn là, lượng nước của hạt cà phê được làm tăng bằng cách xử lý bằng hơi nước, tức là trong bước (a).

Theo cách khác, lượng nước của hạt cà phê có thể được làm tăng bằng cách ngâm sơ bộ hạt cà phê trong nước, ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 30 đến 80°C như khoảng 60°C.

Theo phương án được ưu tiên, bước xử lý bằng hơi nước được thực hiện trong khoảng từ 5 đến 60 phút, tốt hơn là trong khoảng từ 10 đến 30 phút, như trong khoảng 15 phút. Tốt hơn là, bước xử lý bằng hơi nước được thực hiện trong khoảng từ 5 đến 60 phút sau khi đạt được nhiệt độ mong muốn, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10 đến 30 phút, như trong khoảng 15 phút sau khi đạt được nhiệt độ mong muốn.

Hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước sẽ được cho tiếp xúc với asparaginaza trong một khoảng thời gian thích hợp để cho phép asparaginaza phát huy tác dụng của nó.

Khoảng thời gian dành cho việc tiếp xúc với asparaginaza phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Khoảng thời gian cần cho enzym để có thể phản ứng với asparagin sẽ phụ thuộc vào các yếu tố bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mức giảm asparagin (và theo đó là acrylamit) mong muốn, các đặc tính của hạt cà phê cụ thể (ví dụ, loại hạt, thành phần, cỡ hạt), lượng mảnh vụn hoặc bã còn lại, quy trình sản xuất, nồng độ asparagin, và asparaginaza cụ thể được thêm vào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể dễ dàng xác định được thời gian tiếp xúc. Tốt hơn là, enzym này được để cho phản ứng trong khoảng thời gian đủ để tạo ra hạt cà phê trong đó lượng asparagin được làm giảm đi ít nhất khoảng 10%, tốt hơn là ít nhất khoảng 20%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 30%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 40%, và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 50%. Nói chung, enzym được để cho phản ứng càng lâu thì mức giảm asparagin càng lớn và theo đó là mức giảm acrylamit trong hạt cà phê rang càng lớn.

Theo phương án được ưu tiên, việc cho tiếp xúc trong bước (b) là trong khoảng từ 10 đến 240 phút, tốt hơn là trong khoảng từ 30 đến 180 phút, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 45 đến 180 phút.

Bước để một thời gian đủ cho enzym phản ứng có thể được thực hiện theo cách thích hợp bất kỳ; ví dụ asparaginaza có thể được thêm vào ở một nhiệt độ, sau đó làm tăng hoặc làm giảm nhiệt độ dần dần.

Bước cho tiếp xúc với asparaginaza tạo thành bước xử lý bằng asparaginaza.

Như đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, độ pH và nhiệt độ là các yếu tố có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể dễ dàng xác định được các điều kiện tối ưu của các thông số này và các thông số khác (ví dụ, lượng nước). Ngoài ra, các điều kiện tối ưu về độ pH và nhiệt độ đối với các enzym cụ thể cũng thường có sẵn trong tài liệu kỹ thuật và/hoặc từ các nhà cung cấp enzym.

Bước cho tiếp xúc với asparaginaza sẽ được thực hiện ở nhiệt độ mà enzym asparaginaza được sử dụng sẽ có hoạt tính. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể dễ dàng xác định được nhiệt độ dùng cho bước cho tiếp xúc với asparaginaza.

Theo phương án được ưu tiên, việc cho tiếp xúc trong bước (b) được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 25 đến 75°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 50 đến 70°C, như khoảng 60°C.

Theo phương án khác, asparaginaza bền nhiệt được sử dụng và việc cho tiếp xúc trong bước (b) được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn, ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 75 đến 100°C.

Enzym bền nhiệt theo sáng chế có thể được định nghĩa là asparaginaza mà sau khi ủ ở 70°C trong 10 phút sẽ có hoạt tính còn lại là ít nhất 75%.

Hạt cà phê có thể được cho tiếp xúc với asparaginaza bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như bằng cách phun, ngâm, tưới, hoặc bể thống trị (dominant bath).

Theo một phương án, hạt cà phê được cho tiếp xúc với asparaginaza bằng cách phun dung dịch chứa asparaginaza lên hạt cùng với việc khuấy nhẹ các hạt để tạo ra lớp phủ đồng đều cho tất cả bề mặt hạt.

Theo phương án khác, hạt cà phê được cho tiếp xúc với asparaginaza bằng cách ngâm hạt trong dung dịch chứa asparaginaza. Có thể khuấy nhẹ trong quá trình cho tiếp xúc.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể xác định được nồng độ của asparaginaza mà cần được thêm vào hạt cà phê. Hạt cà phê có thể được cho tiếp xúc với asparaginaza với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 30000 ASNU/kg hạt cà phê, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 500 đến 20000 ASNU/kg hạt cà phê, như khoảng 3000 ASNU/kg hạt cà phê.

Sau bước cho tiếp xúc, asparaginaza có thể được khử hoạt tính bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc khử hoạt tính của enzym có thể xảy ra trong quá trình làm nóng, vì vậy bước khử hoạt tính tùy chọn và bước rang hạt cà phê có thể được thực hiện đồng thời. Việc xử lý bằng nhiệt có thể làm biến tính và làm bất hoạt enzym để cho hạt cà phê rang không phải chịu hoạt tính liên tục của enzym nữa.

Sau bước (b) và trước bước (c), hạt cà phê thô có thể được làm khô. Hạt cà phê thô có thể được làm khô đến lượng nước nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến 15% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7 đến 12% khối lượng. Các phương pháp làm khô thích hợp có thể bao gồm làm đông khô, sấy trên đai truyền, sấy chân không, sấy khô bằng lò, sấy tầng sôi, và sự kết hợp của chúng.

Sau bước xử lý bằng asparaginaza và bước làm khô tùy chọn, hạt cà phê được rang để tạo ra hạt cà phê rang. Quy trình thích hợp bất kỳ mà bao gồm việc rang có thể được sử dụng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "rang" bao gồm việc xử lý hạt cà phê bằng nhiệt thích hợp bất kỳ để tạo ra các mùi vị tiêu biểu của cà phê. Các kỹ thuật rang thích hợp có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, rang bằng lò, rang ép đùn, rang bằng hơi nước (ví dụ, không rang sau đó), rang bằng tia hồng ngoại, rang bằng vi sóng, rang bằng cách làm nóng cảm ứng/điện môi, và sự kết hợp của chúng.

Hạt cà phê có thể được rang đến màu rang mong muốn bất kỳ. Màu rang có thể được giám sát bằng các thiết bị khác nhau, Hunterlab hoặc Colur Test

Tùy chọn, hạt cà phê có thể được xay. Bước xay này có thể được thực hiện ở giai đoạn bất kỳ như trước khi hấp hoặc trước hoặc sau khi rang. Tốt hơn là, bước xay được thực hiện sau khi rang.

Hạt cà phê rang có thể được sử dụng ở dạng nguyên hạt hoặc có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm cà phê rang khác nhau, như cà phê rang xay, sản phẩm cô dạng lỏng, cà phê dạng bột hoặc hòa tan, đồ uống có cà phê (ví dụ, cà phê nóng và lạnh pha sẵn, cà phê bán trong máy tự động, cà phê pha tại nhà và thương mại, Kahlua™, cà phê latte, cà phê cappuccino), hỗn hợp pha trộn (ví dụ, hỗn hợp pha trộn cà phê latte), bánh kẹo (ví dụ, kẹo), đồ tráng miệng (ví dụ, bánh ngọt, kem, bánh ngọt nhiều kem, bánh sữa trứng), bánh chiên/nướng (ví dụ, bánh danish, bánh donut), nước sốt, và súp (ví dụ, súp thịt hầm ốt). Theo một phương án, hạt cà phê được làm khô, được rang, sau đó được xay để tạo ra cà phê rang xay.

Hạt cà phê được sản xuất theo phương pháp theo sáng chế có thể được pha trộn với các hạt cà phê khác. Ví dụ, hạt cà phê Robusta được sản xuất theo sáng chế có thể được pha trộn với hạt cà phê Arabica mà có thể có hoặc không được xử lý bằng asparaginaza. Việc pha trộn như vậy có thể được thực hiện ở giai đoạn bất kỳ, ví dụ,

trước hoặc sau khi làm khô tùy chọn, trước hoặc sau khi rang, và/hoặc trước hoặc sau khi xay tùy chọn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hạt cà phê rang có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế như nêu trên.

Asparaginaza

Asparaginaza theo sáng chế có nghĩa là enzym có hoạt tính asparaginaza, tức là enzym xúc tác cho sự thủy phân asparagin thành axit aspartic (EC 3.5.1.1).

Hoạt tính asparaginaza có thể, ví dụ, được xác định theo thử nghiệm về hoạt tính asparaginaza (ASNU) được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một phương án, asparaginaza được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có hoạt tính asparaginaza là ít nhất 20%, ví dụ, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 100% của hoạt tính asparaginaza của polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO: 1 khi được đo ở độ pH 7 và ở 37°C. Hoạt tính asparaginaza có thể được xác định trên mỗi microgam enzym asparaginaza.

Asparaginaza có thể thu được từ nguồn bất kỳ, ví dụ, từ vi sinh vật, từ thực vật hoặc từ động vật.

Asparaginaza có thể thu được từ vi sinh vật thuộc chi bất kỳ, ví dụ, từ vi khuẩn, cổ khuẩn hoặc nấm. Đối với mục đích của sáng chế, thuật ngữ “thu được từ” trong bản mô tả này liên quan đến một nguồn đã nêu sẽ có nghĩa là asparaginaza được mã hóa bởi polynucleotit được tạo ra bởi nguồn này hoặc bởi chủng mà polynucleotit từ nguồn này được chèn vào trong đó.

Nó có thể là asparaginaza kiểu dại, tức là asparaginaza được tìm thấy trong tự nhiên, hoặc nó có thể là asparaginaza biến thể, tức là asparaginaza chứa phần thay đổi, tức là phần thế, phần chèn, và/hoặc phần khuyết, tại một hoặc nhiều (ví dụ, một vài) vị trí so với asparaginaza bố-mẹ mà nó có thể thu được từ đó. Phần thế có nghĩa là sự thay thế axit amin chiếm giữ một vị trí bằng axit amin khác; phần khuyết có nghĩa là sự loại bỏ axit amin chiếm giữ một vị trí; và phần chèn có nghĩa là sự bổ sung axit amin liền kề và ngay sau axit amin chiếm giữ một vị trí.

Asparaginaza hoặc bố-mẹ của nó, tốt hơn là asparaginaza, có thể là asparaginaza từ vi khuẩn. Ví dụ, asparaginaza có thể là asparaginaza từ vi khuẩn gram dương như asparaginaza từ *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, hoặc *Streptomyces*, hoặc asparaginaza từ vi khuẩn gram âm như asparaginaza từ *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, hoặc *Ureaplasma*.

Theo một phương án, asparaginaza là asparaginaza từ *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Bacillus thuringiensis*.

Theo phương án khác, asparaginaza là asparaginaza từ *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, hoặc *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

Theo phương án khác, asparaginaza là asparaginaza từ *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, hoặc *Streptomyces lividans*.

Theo phương án được ưu tiên, asparaginaza hoặc bố-mẹ của nó, tốt hơn là asparaginaza, là asparaginaza từ nấm. Ví dụ, asparaginaza có thể là asparaginaza từ nấm men như asparaginaza từ *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Yarrowia*; hoặc asparaginaza từ nấm sợi như asparaginaza từ *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*,

Scytalidium, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, hoặc *Xylaria*.

Theo một phương án, asparaginaza là asparaginaza từ *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, hoặc *Saccharomyces oviformis*.

Theo phương án khác, asparaginaza là asparaginaza từ *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, hoặc *Trichoderma viride*.

Cần phải hiểu rằng đối với các loài nêu trên, sáng chế bao gồm cả trạng thái hoàn thiện và trạng thái chưa hoàn thiện, và các dạng tương đương về mặt phân loại khác, ví dụ, dạng sinh sản vô tính, không quan tâm đến tên loài mà chúng được biết đến với tên đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nhận thấy độ đồng nhất của các dạng tương đương thích hợp.

Các chủng của các loài này là có thể dễ dàng tiếp cận đối với công chúng trong các bảo tàng giống, như Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC), Bộ sưu tập giống vi sinh vật và mô Cộng hòa Liên bang Đức (DSMZ), Bảo tàng giống vi sinh vật Hà Lan (CBS), và Bảo tàng giống dùng cho sáng chế của Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp, Trung tâm nghiên cứu khu vực phía Bắc (NRRL).

Asparaginaza có thể được nhận diện và thu được từ các nguồn khác bao gồm các vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên (ví dụ, đất, phân ủ, nước, v.v..) hoặc các mẫu ADN thu được trực tiếp từ các vật liệu tự nhiên (ví dụ, đất, phân ủ, nước, v.v..). Các kỹ thuật phân lập các vi sinh vật và ADN trực tiếp từ môi trường sống tự nhiên là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, polynucleotit mã hóa asparaginaza có thể thu được bằng cách sàng lọc tương tự thư viện cADN hoặc ADN thuộc hệ gen của vi sinh vật hoặc mẫu ADN hỗn hợp khác. Khi polynucleotit mã hóa asparaginaza được phát hiện, thì polynucleotit này có thể được phân lập hoặc được tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor, New York).

Theo một phương án được ưu tiên, asparaginaza hoặc bố-mẹ của nó, tốt hơn là asparaginaza, thu được từ *Aspergillus*, ví dụ, từ *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus terreus*.

Theo phương án được ưu tiên khác, asparaginaza hoặc bố-mẹ của nó, tốt hơn là asparaginaza, được thu nhận từ *Aspergillus oryzae*, ví dụ, asparaginaza có SEQ ID NO: 1 hoặc polypeptit trưởng thành của nó. Theo phương án được ưu tiên khác, asparaginaza hoặc bố-mẹ của nó, tốt hơn là asparaginaza, thu được từ *Aspergillus niger*, ví dụ, asparaginaza có SEQ ID NO: 2 hoặc polypeptit trưởng thành của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác, asparaginaza có độ đồng nhất trình tự là ít nhất 50% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2, như độ đồng nhất trình tự là ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít

nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

SEQ ID NO: 1 là trình tự axit amin của asparaginaza từ *Aspergillus oryzae*.

Trong sáng chế, thuật ngữ “polypeptit trưởng thành” có nghĩa là polypeptit ở dạng cuối cùng của nó sau khi dịch mã và các cải biến sau dịch mã bất kỳ, như xử lý đầu cuối N, cắt cụt đầu cuối C, glycosyl hóa, phosphoryl hóa, v.v.. Đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là tế bào chủ có thể tạo ra hỗn hợp chứa hai hoặc nhiều polypeptit trưởng thành khác nhau (tức là với axit amin đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C khác nhau) mà được thể hiện bằng cùng một polynucleotit.

Dựa trên cơ sở phân tích trình tự đầu cuối N và phân tích khối phổ (MS: mass spectrometry), có vẻ như là việc xử lý đầu cuối N của asparaginaza có SEQ ID NO: 1 là rất không đồng nhất. Theo một phương án, polypeptit trưởng thành là các axit amin từ 20 đến 378 có SEQ ID NO: 1, dựa trên cơ sở SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) mà dự đoán rằng các axit amin từ 1 đến 19 có SEQ ID NO: 1 là peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin của asparaginaza từ *Aspergillus niger*. Theo một phương án, polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO: 2 là các axit amin từ 18 đến 378 có SEQ ID NO: 2, dựa trên cơ sở peptit tín hiệu đã được dự đoán là các axit amin 1-17.

Đối với mục đích của sáng chế, độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), ưu tiên là phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản mới hơn. Các thông số được sử dụng là điểm phạt mở khoảng trống là 10, điểm phạt mở rộng khoảng trống là 0,5, và ma trận thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Dữ liệu đầu ra của Needle, gọi là “độ đồng nhất dài nhất” (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn –nobrief), được sử dụng làm độ đồng nhất tính theo phần trăm và được tính toán như sau:

(Các gốc đồng nhất x 100)/(Chiều dài phần sắp hàng – Tổng số khoảng trống trong phần sắp hàng)

Theo phương án được ưu tiên khác, asparaginaza là biến thể của asparaginaza bố-mẹ có độ đồng nhất trình tự là ít nhất 50% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2, như độ đồng nhất trình tự là ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo phương án được ưu tiên hơn, asparaginaza là biến thể của asparaginaza bố-mẹ có độ đồng nhất trình tự là ít nhất 50% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO: 1, như độ đồng nhất trình tự là ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO: 1.

Theo phương án được ưu tiên khác, asparaginaza chứa nhiều nhất là 100, tốt hơn là nhiều nhất là 80 hoặc nhiều nhất là 50, tốt hơn nữa nếu nhiều nhất là 25, nhiều nhất là 20, nhiều nhất là 15, nhiều nhất là 10 hoặc nhiều nhất là 5 sai khác về axit amin so với polypeptit trưởng thành có SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo phương án khác, asparaginaza là asparaginaza bền nhiệt, ví dụ, asparaginaza từ *Pyrococcus furiosus* được bộc lộ trong WO2008/151807.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp

Thử nghiệm về hoạt tính asparaginaza (ASNU)

Hoạt tính của asparaginaza có thể được đo bằng đơn vị ASNU. Một đơn vị asparaginaza (ASNU: asparaginase unit) được định nghĩa là lượng enzym cần để tạo ra 1,0 micromol amoni trong 1 phút ở 37°C và độ pH 7,0, trong đệm MOPS 0,1M với

asparagin 9,2 mg/mL.

Asparaginaza thủy phân asparagin thành axit aspartic và amoni. Amoni đã được tạo ra được kết hợp với α -ketoglutarat để tạo ra axit glutamic, nhờ đó NADH được oxy hóa thành NAD⁺. Phản ứng này được xúc tác bởi một lượng glutamat dehydrogenaza dư. Sự tiêu thụ NADH được đo bằng phương pháp đo quang ở 340 nm. NADH có độ hấp thụ ở 340 nm, trong khi đó NAD⁺ không có độ hấp thụ. Sự giảm màu được đo theo đó, và có thể có tương quan với hoạt tính asparaginaza.

Hoạt tính được xác định dựa vào chất chuẩn asparaginaza có hoạt tính đã biết. Sản phẩm thương mại có hoạt tính đã được công bố như Acrylaway® có thể được sử dụng làm chất chuẩn.

Định lượng asparagin và axit aspartic bằng kỹ thuật HPLC

Lượng asparagin và axit aspartic của các mẫu có thể được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng áp suất cao ThermoFisher WPS3000 bao gồm bơm bốn thành phần, bộ lấy mẫu tự động có kiểm soát nhiệt độ, lò chứa cột và bộ phận phát hiện huỳnh quang có thể điều chỉnh được.

Các mẫu được phân tích sau khi được chuyển hóa tự động thành dẫn xuất trước khi đưa vào cột. 30 μ L nước milli-Q, 10 μ L đệm borat 0,4M có độ pH=10,2, 2 μ L mẫu, và 2 μ L ortho-phthalaldehyt 10 g/L trong đệm borat 0,4M có độ pH=10,2 được thu lại và được trộn bằng cách hút lên và nhả xuống bằng pipet trong lọ trộn; 100 μ L nước milli-Q được thêm vào, và cuối cùng 2 μ L được tiêm vào để phân tích sắc ký trên cột Agilent zorbax eclipse AAA (4,6 mm x 150 mm, cỡ hạt 3,5 μ m) với cột bảo vệ tương ứng.

Bơm được thiết đặt đến lưu lượng cố định là 2mL/phút, cột được làm cân bằng ban đầu bằng đệm phosphat 20 mM, độ pH=7,5 và asparagin được rửa giải bằng gradien tuyến tính từ 4 phút đến 12 phút từ 0% đến 100% của hỗn hợp chứa 45% metanol 45% axetonitril 10% nước. Huỳnh quang của dẫn xuất asparagin thoát ra với ánh sáng ở 340 nm và sự phát xạ được định lượng ở 450 nm. Các mẫu được phân tích bằng cách so sánh với axit aspartic và asparagin chuẩn trong khoảng nồng độ từ 0,05 g/L đến 0,75 g/L.

Ví dụ 1

Xử lý hạt cà phê Robusta có hấp và không hấp bằng asparaginaza

Thiết lập mô hình thử nghiệm về asparaginaza để xử lý hạt Robusta Việt Nam

Quy trình hấp

Trong nồi hấp được sử dụng, chỉ có thể thu được lượng nước cuối cùng trong các hạt là 20% khối lượng vì không thể điều chỉnh lượng nước/hơi nước đầu vào cao hơn mức này được. Do đó, bước ngâm sơ bộ được đưa vào trước khi quy trình hấp được thực hiện trong nồi hấp. Tuy nhiên, đối với mục đích đã nêu, trên thị trường đã có bán thiết bị hấp linh hoạt hơn, trong trường hợp này bước ngâm sơ bộ có thể là không cần thiết vì lượng nước của hạt cà phê có thể được làm tăng đến mức mong muốn bằng cách xử lý bằng hơi nước.

Ngâm sơ bộ: 5,0 kg hạt Robusta Việt Nam + lên tới 2,25 L nước máy được trộn nhẹ nhàng. Tiếp tục trộn cho đến khi tất cả nước đều được hấp thụ bởi các hạt, khoảng 20-30 phút.

Hấp: Bước hấp được thực hiện bằng nồi hấp Systec XV 65 Autoclave, chương trình số 3, bước hấp diễn ra ở 110-120°C trong 15 phút.

Xử lý bằng enzym và làm khô

4,5 L nước máy và 0 hoặc 3000 ASNU Acrylaway® CB, L/kg hạt được thêm vào 5,0 kg hạt (lượng ban đầu) trong điều kiện trộn nhẹ ở 60°C trong 60 đến 120 phút. Nước và enzym được thêm vào từ từ.

Sau khi xử lý bằng enzym, các hạt cà phê xanh được làm khô đến khoảng 10% khối lượng nước trong tầng sôi với nhiệt độ đầu vào là 60°C và với lưu lượng không khí là 300m³/giờ trong 1,5 giờ đầu tiên và với nhiệt độ đầu vào là 50°C và lưu lượng không khí là 250 m³/giờ trong 2,5 giờ tiếp theo.

Rang và phân tích acrylamit

125 g hạt cà phê đã được làm khô từ thử nghiệm về tác dụng của enzym được rang đến giá trị màu LRU là 80. Sau đó, các hạt này được phân tích về acrylamit bằng cách sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS.

Kết quả

Ban đầu, 5 kg hạt Robusta Việt Nam xanh được hấp ở 110°C với tổng lượng nước là 35% khối lượng (thu được trong bước ngâm sơ bộ và hấp như nêu trên). 0 hoặc 3000 ASNU Acrylaway® CB, L/kg hạt cà phê được thêm vào và được để cho phản ứng trong 120 phút trong điều kiện trộn nhẹ. Sau khi làm khô và rang, sự giảm acrylamit được đo là 38% đối với mẫu được xử lý bằng enzym trong khi mẫu đối chứng tạo ra sự giảm acrylamit là 3%. Trong cả hai trường hợp, sự giảm được so sánh với đối chứng quy trình tương ứng không có enzym.

Sau đó, thời gian xử lý bằng enzym được làm giảm từ 120 phút xuống 60 phút; các thông số còn lại được giữ cố định. Việc xử lý bằng enzym trong 60 phút dẫn đến sự giảm lượng acrylamit là 33%. Sau đó, thử nghiệm về việc tăng nhiệt độ hấp từ 110 đến 120°C được thử nghiệm. Bất ngờ là, sự giảm acrylamit thu được lúc này chỉ là 4%.

		Nhiệt độ hấp – lượng nước	ASNU enzym/kg hạt	Thời gian phản ứng với enzym	Acrymit ppb Hạt xanh	Acrymit ppb Hạt rang	Sự giảm AA
1	Đối chứng quy trình	110°C, 35% nước	0	120 phút	-	290	38%
2	Được xử lý bằng enzym	110°C, 35% nước	3000	120 phút	-	180	
3	Đối chứng quy trình	Không hấp	0	120 phút	-	300	3%
4	Được xử lý bằng enzym	Không hấp	3000	120 phút	-	290	
5	Đối chứng quy trình	110°C, 35% nước	0	60 phút	<50	300	33%
6	Được xử lý bằng enzym	110°C, 35% nước	3000	60 phút	<50	200	
7	Đối chứng quy trình	120°C, 35% nước	0	60 phút	80	230	4%

8	Được xử lý bằng enzym	120°C, 35% nước	3000	60 phút	70	220	
9	Hạt xanh	Không hấp	0	ngâm	<50	-	-
10	Hạt xanh	110°C, 8% nước (ở dạng nguyên trạng)	0	Không ngâm	140	-	-

Các mục 3 và 4 cho thấy rằng việc xử lý bằng asparaginaza mà không có bước hấp trước đó hầu như không tạo ra bất kỳ sự giảm acrylamit nào. Việc so sánh các mục 5 và 6 với các mục 7 và 8 cho thấy rằng nhiệt độ hấp là quan trọng đối với sự giảm acrylamit. Việc so sánh lượng acrylamit của các hạt xanh (chưa được rang) trong các mục 5 và 6 có lượng nước là 35% với mục 10 trong đó bước hấp được thực hiện trên hạt xanh ở dạng nguyên trạng có lượng nước là 8% cho thấy rằng lượng nước là quan trọng. Khi hạt xanh có lượng nước thấp được xử lý bằng hơi nước, đo được 140 ppb axylamit trước khi rang. Acrylamit được tạo ra trong bước xử lý bằng hơi nước sẽ không được làm giảm bằng việc xử lý bằng asparaginaza sau đó.

Ví dụ 2

Xử lý hạt cà phê Arabica có hấp và không hấp bằng asparaginaza

Các hạt Arabica đã được xử lý bằng asparaginaza ở quy mô 5 g được thử nghiệm với việc có và không có bước hấp trước bước xử lý bằng enzym. Trong trường hợp này, chỉ theo dõi sự giảm asparagin; tuy nhiên đã biết rõ là tiền chất chính của sự giảm acrylamit là asparagin.

Các hạt cà phê Arabica xanh chưa được rửa được thu nhận từ CR3 (CR3 - Kaffeeveredelung M. Hermsen GmbH, Bremen, Đức) vào năm 2010. Các hạt này được thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm cùng với và không cùng với asparaginaza, Acrylaway® CB, L và có hấp và không hấp.

Các phần 5,0 g hạt cà phê Arabica xanh chưa được rửa, có lượng nước là 6,5% khối lượng, được hấp trong 45 phút ở 100°C trong các giá treo nhỏ được gắn vào nồi hấp hơi chứa 1 L nước khử ion sôi. Sau khi hấp, lượng nước đã được hấp thụ được xác định theo cách định lượng. Sau đó, các hạt được thêm vào 4,2 mL nước khử ion đã được làm nóng (60°C) chứa 0 ASNU Acrylaway® CB, L/kg hoặc 3000 ASNU/kg

Acrylaway® CB, L. Các phần 5 g hạt khác chỉ được thêm vào 4,2mL nước khử ion đã được làm nóng (60°C) chứa 0 ASNU Acrylaway® CB, L/kg hoặc 3000 ASNU/kg Acrylaway® CB, L. Tất cả các liều lượng đều được thử nghiệm trong bốn lần lặp lại. Các mẫu được ủ ở 60°C trong 45 phút với tốc độ khuấy là 20 vòng/phút. Sau 45-60 phút, nước được hấp thụ hoàn toàn bởi các hạt.

Lượng tương đương với 5 g hạt xanh khô ban đầu được xay; axit clohydric được thêm vào để làm bất hoạt enzym và để chiết asparagin. Sau khi chiết, các hạt được lọc và được giữ ở -18°C cho đến phân tích tiếp theo.

Lượng asparagin được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng áp suất cao, các axit amin được phân tích bằng cách chuyển hóa thành dẫn xuất trước khi đưa vào cột và huỳnh quang được định lượng.

	Asparagin	
	mg/kg	mg/kg trung bình
Trắng, không hấp	427	
Trắng, không hấp	339	407
Trắng, không hấp	345	
Trắng, không hấp	513	
Không hấp, Acrylaway 3000 U/kg	215	
Không hấp, Acrylaway 3000 U/kg	101	172
Không hấp, Acrylaway 3000 U/kg	125	
Không hấp, Acrylaway 3000 U/kg	248	
Trắng, hấp 45 phút	463	
Trắng, hấp 45 phút	514	447
Trắng, hấp 45 phút	415	
Trắng, hấp 45 phút	398	
Hấp 45 phút, Acrylaway 3000 U/kg	124	
Hấp 45 phút, Acrylaway 3000 U/kg	109	
Hấp 45 phút, Acrylaway 3000 U/kg	76	133
Hấp 45 phút, Acrylaway 3000 U/kg	223	

Khi sử dụng hạt cà phê Arabica, cũng quan sát thấy sự giảm asparagin gây ra bởi enzym đáng kể khi không có bước hấp trước đó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hạt cà phê rang, phương pháp này bao gồm các bước:
 - (a) xử lý hạt cà phê Robusta thô bằng hơi nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 105 đến 115°C;
 - (b) cho hạt cà phê thô đã được xử lý bằng hơi nước tiếp xúc với asparaginaza; và
 - (c) rang hạt cà phê thô đã được xử lý bằng asparaginaza.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trước hoặc trong bước (a), lượng nước của hạt cà phê được tăng đến lượng nằm trong khoảng từ 30% khối lượng đến 45% khối lượng như 35% khối lượng.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lượng nước của hạt cà phê được tăng bằng cách xử lý hơi.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước (a) được thực hiện trong khoảng thời gian từ 5 đến 60 phút, tốt hơn là từ 10-30 phút như trong 15 phút.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó việc cho tiếp xúc ở bước (b) là trong khoảng thời gian từ 10 đến 240 phút, tốt hơn là từ 30 đến 180 phút, tốt hơn nữa là từ 45 đến 180 phút.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước (b) được thực hiện bằng cách cho tiếp xúc với asparaginaza ở nồng độ từ 100 đến 30.000 ASNU/kg hạt cà phê, tốt hơn là từ 500 đến 20.000 ASNU/kg hạt cà phê như 3.000 ASNU/kg hạt cà phê.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sau bước (b) và trước bước (c), hạt cà phê thô được sấy đến hàm lượng nước là từ 5 đến 15% khối lượng, tốt hơn là từ 7 đến 12% khối lượng.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt cà phê được xay sau bước (c).

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó asparaginaza này thu được từ *Aspergillus*, tốt hơn là *A. oryzae* hoặc *A. niger*, hoặc là biến thể của asparaginaza bố-mẹ thu được từ *Aspergillus*, tốt hơn là *A. oryzae* hoặc *A. niger*.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó asparaginaza này bao gồm sự khác biệt nhiều nhất là 100, tốt hơn là nhiều nhất 80 hoặc nhiều nhất 50, tốt hơn nữa là nhiều nhất 25, nhiều nhất 20, nhiều nhất 15, nhiều nhất 10 hoặc nhiều nhất 5 axit amin so với polypeptit tự nhiên của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó asparaginaza này có độ đồng nhất trình tự ít nhất 50% với polypeptit tự nhiên của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2, như có độ đồng nhất trình tự ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit tự nhiên của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó asparaginaza này là asparaginaza bền nhiệt.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novozymes A/S

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT CÀ PHÊ RANG

<130> 12673-WO-PCT

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 378

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 1

Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile
 1 5 10 15

Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val
 20 25 30

Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn
 35 40 45

Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala
 50 55 60

Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala
 65 70 75 80

Val Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val
 85 90 95

Ala Asn Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile
 100 105 110

Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val
 115 120 125

Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp
 130 135 140

Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg
 145 150 155 160

Lys Pro Val Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser
 165 170 175

Ala Asp Gly Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser
 180 185 190

Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile
 195 200 205

Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr
 210 215 220

Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys
 225 230 235 240

Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val
 245 250 255

Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser
 260 265 270

Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly
 275 280 285

Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr
 290 295 300

Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro
 305 310 315 320

Ile Val Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala
 325 330 335

Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg
 340 345 350

Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met

355

360

365

Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala
 370 375

<210> 2

<211> 378

<212> PRT

<213> Aspergillus niger

<400> 2

Met Pro Leu Lys Pro Ile Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Asn Glu Thr Phe Val Phe
 20 25 30

Thr Asn Ala Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro
 35 40 45

Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ser
 50 55 60

Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Leu
 65 70 75 80

Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Ser Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala
 85 90 95

Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Glu Asp Ile Thr Ser Asp Ile
 100 105 110

Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn Arg Val Val Cys Glu Asp Pro
 115 120 125

Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu
 130 135 140

Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val
 145 150 155 160

Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro
 165 170 175

Phe Asn Leu Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Thr Ser Ala Arg
 180 185 190

Asp Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg Ile Ala Ser Ala Tyr
 195 200 205

Tyr Val Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Met
 210 215 220

Glu Met Gly Tyr Leu Gly Glu Met Ile Ser Asn Thr Pro Phe Phe Phe
 225 230 235 240

Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Val Ala Phe Asp Ile Thr Asn
 245 250 255

Val Thr Glu Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Phe Ser Tyr Glu Asp Met
 260 265 270

His Asn Asp Thr Leu Tyr Asn Ala Ile Ser Ser Gly Ala Gln Gly Ile
 275 280 285

Val Ile Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Val Thr Thr Ser Phe Asn Glu
 290 295 300

Ala Ile Glu Asp Val Ile Asn Arg Leu Glu Ile Pro Val Val Gln Ser
 305 310 315 320

Met Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Leu Ser Asp Val Ser Ser Asp
 325 330 335

Thr Ala Thr His Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg
 340 345 350

Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ser Gln Gly Lys Asn Ile Thr Glu Ile
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Ala Leu Gly Thr Asp Ala
 370 375