



(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)



1-0026035

(51)⁷ C12G 1/022; C12C 5/00; A23L 2/84;
C12C 11/00

(13) B

(21) 1-2015-02542

(22) 10/12/2013

(86) PCT/EP2013/076087 10/12/2013

(87) WO2014/090803 19/06/2014

(30) 12196433.2 11/12/2012 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/09/2015 330A

(73) DSM IP Assets B. V. (NL)

Het Overloon 1, NL- 6411 TE Heerlen, The Netherlands

(72) MUTSAERS, Johanna Henrica Gerdina Maria (NL); EDENS, Luppo (NL); HEIJNE, Wilbert Herman Marie (NL).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống bao gồm bước thêm proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza vào đồ uống, và bước chế biến đồ uống, và đồ uống có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống ổn định trong một khoảng thời gian dài.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vẩn đục là hiện tượng đã biết rõ trong ngành công nghiệp đồ uống. Vẩn đục có thể có mặt trong bia, rượu và nước hoa quả. Sự hình thành vẩn đục có thể xảy ra ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình nấu bia. Tài liệu “Enzym in food processing” biên tập bởi T. Nagodawithana và G. Reed, tái bản lần thứ 3, Academic press Inc., San Diego, Chương V, trang 448-449, cho rằng vẩn đục trong bia là kết quả của sự tương tác giữa các protein có trong bia và proxyanidin polyphenol. Tài liệu này giải thích rằng trong bia, vẩn đục thường được tạo thành khi làm lạnh bia. Bia được lên men, ủ, làm ổn định lạnh và cuối cùng đóng gói thường trong điều kiện được làm lạnh. Để đạt được độ trong, bia thường được lọc trong khi lạnh. Dù đã được lọc, nhưng bia có thể thường trở nên mờ đục sau khi được đóng gói và phân phối đến khách hàng và làm lạnh lần nữa trước khi uống. Cuối cùng thì vẩn đục thậm chí còn có thể được hình thành trong bia khi nó không được làm lạnh hoặc không được làm lạnh nữa và chất lắng cặn có thể phát triển. Sự hình thành vẩn đục là không mong muốn do sự mờ đục gây ra bởi sự hình thành vẩn đục giống như sự mờ đục được tạo ra bởi sự hư hỏng do vi khuẩn, là điều không mong muốn, đặc biệt là đối với bia sáng màu.

WO2002/046381 mô tả quy trình để làm giảm vẩn đục trong đồ uống bằng cách thêm endoproteaza đặc hiệu prolin vào đồ uống. WO2002/046381 còn mô tả rằng bằng cách làm giảm vẩn đục bằng endoproteaza đặc hiệu prolin, hàm lượng chất chống oxy hóa cao, như polyphenol vẫn có mặt trong đồ uống. Polyphenol

có tính chất chống oxy hóa này được cho là thành phần có giá trị cải thiện sức khỏe.

WO2003/104382 mô tả rằng ngoài việc bổ sung endoproteaza đặc hiệu prolin để làm giảm vẩn đục trong đồ uống, độ tan của peptit có thể được tăng bằng cách thêm exo- và/hoặc endoproteaza bổ sung vào đồ uống, bằng cách đó, sự tương tác giữa polypeptit còn lại với polyphenol được cho rằng sẽ giảm tiếp.

Ngoài protein, polyphenol cũng được cho là có liên quan đến sự hình thành vẩn đục. Sự kết tủa của protein được cho là được kích thích bởi các lượng nhỏ polyphenol (Minussi et al., Trends in Food Science and Technology 2002, tập 13, trang 205-216). US 4,411,914 mô tả độ ổn định keo của bia có thể được cải thiện bằng cách thêm polyphenoloxidaza để oxy hóa polyphenol và sau đó loại bỏ chất kết tủa tạo ra.

Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng sau khi thêm chỉ riêng hoặc endoproteaza đặc hiệu prolin hoặc polyphenoloxidaza, vẩn đục vẫn có thể được tạo thành trong đồ uống như bia sau thời gian bảo quản kéo dài.

Mục đích của sáng chế là sản xuất đồ uống ổn định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống, trong đó quy trình này bao gồm bước thêm proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza vào đồ uống, và bước chế biến đồ uống.

Có lợi khi phát hiện ra rằng cũng sau thời gian bảo quản kéo dài, vẩn đục được tạo ra ít hơn trong đồ uống, như bia, đã được xử lý bằng proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza khi so sánh với đồ uống được xử lý chỉ bằng một trong số các enzym nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Vắn đục trong bia ở 20°C đo ở góc tán xạ H25 sau khi bảo quản tới 6 tháng. Bia được sản xuất với sự có mặt của endoproteaza đặc hiệu prolin (Brewers ClarexTM), polyphenoloxidaza (Laccase M120), Brewers Clarex và Laccase M120 hoặc không thêm enzym (Tham chiếu).

Fig.2. Vắn đục trong bia ở 20°C đo ở góc tán xạ H90 sau khi bảo quản tới 6 tháng. Bia được sản xuất với sự có mặt của endoproteaza đặc hiệu prolin (Brewers ClarexTM), polyphenoloxidaza (Laccase M120), Brewers Clarex và Laccase M120 hoặc không thêm enzym (Tham chiếu).

Fig.3. Vắn đục trong bia ở 0°C đo ở góc tán xạ H25 sau khi bảo quản tới 6 tháng. Bia được sản xuất với sự có mặt của endoproteaza đặc hiệu prolin (Brewers ClarexTM), polyphenoloxidaza (Laccase M120), Brewers Clarex và Laccase M120 hoặc không thêm enzym (Tham chiếu).

Fig.4. Vắn đục trong bia ở 0°C đo ở góc tán xạ H90 sau khi bảo quản tới 6 tháng. Bia được sản xuất với sự có mặt của endoproteaza đặc hiệu prolin (Brewers ClarexTM), polyphenoloxidaza (Laccase M120), Brewers Clarex và Laccase M120 hoặc không thêm enzym (Tham chiếu).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống bao gồm bước thêm proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza vào đồ uống, và bước chế biến đồ uống.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đồ uống” bao gồm đồ uống ở tất cả các giai đoạn trong quá trình sản xuất chúng. Đồ uống không chỉ là đồ uống sẵn sàng để sử dụng, mà cũng có thể là dạng trung gian bất kỳ của đồ uống. Dạng trung gian của đồ uống có thể không hoàn toàn là chất lỏng. Ví dụ, hèm rượu như

được sử dụng trong quá trình sản xuất bia được bao hàm bởi thuật ngữ “đồ uống”.

Theo một phương án, đồ uống là bia. Bia trong quy trình như được bộc lộ ở đây có thể là bia được sản xuất từ dịch ngâm từ ngũ cốc chưa ủ malt, cũng như ngũ cốc đã ủ malt, hoặc từ dịch ngâm được tạo ra từ hỗn hợp bao gồm ngũ cốc đã ủ malt và chưa ủ malt. Ví dụ về ngũ cốc mà từ đó bia có thể được sản xuất là lúa mạch và lúa mì. Ngoài ra, bia có thể được sản xuất cùng với các chất bổ sung như ngô, gạo hoặc sắn. Bia như được sử dụng ở đây có thể có mọi hàm lượng rượu có thể, ví dụ nằm trong khoảng từ 0 đến 12% thể tích, như từ 1 đến 10% thể tích, hoặc từ 2 đến 8% thể tích. Có sự khác biệt lớn trong các quy trình sản xuất bia mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Thông thường, quy trình sản xuất bia bao gồm bước sản xuất dịch ngâm và tách hèm rượu ra khỏi dịch ngâm, bước lên men, bước ủ, và bước làm ổn định. Một số quy trình sản xuất bia bao gồm bước lọc bia. Trong một số quy trình, bước lên men được biết là bước lên men sơ bộ. Bước lên men là bước trong quá trình nấu bia được dự định để lên men các đường có sẵn thành rượu bằng cách bổ sung men. Bước ủ còn được gọi là bước lên men thứ cấp và được dự định để chuyển hóa các thành phần có mùi vị không mong muốn như diketone thành các thành phần có vị tốt hơn. Bước làm ổn định được dự định để thúc đẩy tạo ra chất kết tụ polyphenol-protein và có thể kết tủa. Tùy ý, quy trình sản xuất bia bao gồm bước lọc, ví dụ sau khi làm ổn định. Thông thường, bia được đóng gói sau khi làm ổn định và/hoặc lọc ví dụ trong chai, can hoặc thùng.

Nói chung, trong quá trình nấu bia một số thông số có thể được kiểm tra. Ở thời điểm cuối của bước lên men, ví dụ, có thể được xác định bằng cách đo khối lượng riêng của bia thu được. Nói chung, thời điểm cuối của bước lên men được cho là thời điểm bắt đầu của bước ủ. Thời điểm cuối cùng của bước ủ và lúc đó, thời điểm bắt đầu của bước làm ổn định có thể được xác định bằng cách đo lượng di-acetyl có mặt trong bia. Tuy nhiên, trong thực tế, hàm lượng di-acetyl có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bia mong muốn.

Theo phương án khác, đồ uống trong quy trình như bộc lộ ở đây là rượu hoặc nước hoa quả. Rượu thường được sản xuất từ nho. Nước hoa quả có thể là nước hoa quả, ví dụ, thu được từ quả mọng có màu đỏ, quả dâu tây, quả táo, quả lê, quả cà chua, quả họ cam, rau, v.v..

Proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza có thể được thêm vào đồ uống trong bước thích hợp bất kỳ trong quy trình sản xuất đồ uống. Proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza không cần thiết được thêm vào ở cùng một thời điểm, mà có thể được thêm vào ở bước khác trong quy trình sản xuất đồ uống. Do polyphenoloxidaza cần oxy để hoạt động, thực chất là oxy có mặt trong đồ uống trong ít nhất một bước nào đó trong quy trình sản xuất đồ uống. Trong trường hợp đồ uống là bia, proteaza đặc hiệu prolin và/hoặc polyphenoloxidaza có thể được thêm vào trong bước lên men trong quy trình sản xuất bia. Theo cách khác, proteaza đặc hiệu prolin và/hoặc polyphenoloxidaza có thể được thêm vào trước bước lên men trong quy trình sản xuất bia. Proteaza đặc hiệu prolin và/hoặc polyphenoloxidaza cũng có thể được thêm vào bia sau bước lên men, ví dụ trong hoặc sau bước làm ổn định lạnh, trong quy trình sản xuất bia.

Theo một phương án của quy trình được bộc lộ ở đây đồ uống là nước hoa quả hoặc rượu.

Trong quy trình sản xuất nước hoa quả, proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza có thể được thêm vào trong bước ngâm hoặc bước loại pectin.

Trong quy trình sản xuất rượu, proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza có thể được thêm vào trong hoặc sau bước lên men rượu hoặc sau bước lên men malolactic.

Do sự hình thành vẩn đục thường xảy ra trong đồ uống có tính axit như bia, nước hoa quả và rượu, proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza có lợi nếu có độ pH tối ưu để hoạt động ở độ pH dưới pH=7, nhưng không phải là chủ yếu.

Ví dụ, proteaza đặc hiệu prolin có độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 3 đến 7. Polyphenoloxidaza có thể có độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 4 đến 7. Độ pH tối ưu của proteaza đặc hiệu prolin và/hoặc polyphenoloxidaza được đo theo phương pháp được thể hiện trong phần Nguyên liệu và phương pháp dưới đây.

Trong quy trình sản xuất bia, độ pH của bia ở thời điểm bắt đầu bước lên men có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 6 và trong bước lên men độ pH thường giảm đến pH=4.

Lượng proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza được thêm vào đồ uống có thể thay đổi nằm trong các giới hạn rộng và, trong số các yếu tố khác, là phụ thuộc vào lượng protein và polyphenol có mặt trong chất ban đầu, như lúa mạch, lúa mì trong trường hợp của bia, hoặc hoa quả mà từ đó đồ uống được sản xuất. Lượng thích hợp của proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza được thêm vào đồ uống có thể nằm trong khoảng từ 0,1mg/l đến 200mg/l, từ 0,5mg/l đến 100mg/l, từ 1 đến 50mg/l, từ 0,05mg/l đến 10mg/l.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ vẩn đục, đục và mờ đục có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Vẩn đục, đục hoặc mờ đục có thể được tạo ra do kết quả của các tương tác protein-polyphenol hoặc polyphenol-polyphenol.

Polyphenol được xác định là hợp chất có cấu trúc hóa học, trong đó cấu trúc này chứa ít nhất hai vòng thơm được thế bằng ít nhất một nhóm hydroxyl hoặc có cấu trúc hóa học trong đó chứa ít nhất một vòng thơm được thế bằng ít nhất hai nhóm hydroxyl. Ví dụ về polyphenol là tanin và flavonoid, ví dụ catechin, flavonol và anthocyanin.

Các thuật ngữ peptit hoặc protein được sử dụng thay thế cho nhau ở đây. Peptit hoặc protein là polyme của các monome axit amin.

Endoproteaza đặc hiệu prolin được xác định ở đây là endoproteaza có tác dụng cắt protein hoặc peptit ở các vị trí tại đó protein hoặc peptit chứa gốc prolin

trong mạch của nó.

Hệ thống nhận dạng quốc tế để phân loại và gọi tên tất cả các enzym của Hiệp hội quốc tế hóa sinh và sinh học phân tử (IUBMB: International Union of Biochemistry và Molecular Biology) bao gồm cả proteaza. Văn bản IUBMB cập nhật số lượng proteaza EC có thể được tìm thấy ở trang web của IUBMB. Trong hệ thống này, enzym được xác định bởi sự thật là chúng xúc tác một phản ứng duy nhất. Hệ thống này phân loại proteaza thành endo- và exoproteaza. Endoproteaza là các enzym thủy phân các liên kết nội peptit, exoproteaza thủy phân các liên kết peptit liên kế với nhóm α -amin đầu tận cùng ("aminopeptidaza"), hoặc liên kết peptit giữa nhóm carboxyl đầu tận cùng và axit amin gần cuối ("carboxypeptidaza"). Endoproteaza được chia thành các phân lớp phụ trên cơ sở cơ chế xúc tác. Có các phân lớp phụ của serin endoproteaza (EC 3.4.21), xystein endoproteaza (EC 3.4.22), aspartic endoproteaza (EC 3.4.23), metalloendoproteaza (EC 3.4.24) và threonin endoproteaza (EC 3.4.25).

WO2002/046381 mô tả endoproteaza đặc hiệu prolin có thể thu được từ *Aspergillus niger*. Endoproteaza đặc hiệu prolin thuộc về lớp phụ của serin endoproteaza (EC 3.4.21). Endoproteaza đặc hiệu prolin trong quy trình theo sáng chế thuộc về phân loại enzym EC 3.4.21.26.

Proteaza đặc hiệu prolin thích hợp trong quy trình theo sáng chế có thể là endoproteaza đặc hiệu prolin hoặc oligopeptidaza đặc hiệu prolin, tốt hơn là endoproteaza đặc hiệu prolin. Endoproteaza đặc hiệu prolin thích hợp hoặc oligopeptidaza đặc hiệu prolin có thể được tạo ra từ vi sinh vật thích hợp bất kỳ, ví dụ *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulata*, *Penicillium* sp., ví dụ *Penicillium chrysogenum* hoặc *Aspergillus* sp. ví dụ *A. niger*.

Polyphenoloxidaza trong quy trình theo sáng chế thuộc về phân loại E.C. enzym E.C 1.10.3.1 (catechol oxidaza), EC 1.10.3.2 (laccaza) hoặc E.C.1.14.18.1 (monophenol mono-oxidaza). Polyphenol oxidaza là nhóm enzym oxy hóa

mono- hoặc di-phenol hoặc dẫn xuất của chúng. Polyphenol oxidaza là phổ biến trong tự nhiên và tìm thấy trong thực vật, vi khuẩn và nấm. Polyphenol oxidaza trong quy trình như được bộc lộ ở đây có thể được tạo ra từ *Trametes* sp. như *Trametes versicolor*, và *Trametes villosa*, *Agaricus bisporus*, *Streptomyces coelicolor*, *Pleurotus* sp. như *P. ostreatus*, *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus* sp, *Neurospora*, và *Bacillus* sp.

Enzym proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza như được bộc lộ ở đây có thể được tạo ra bằng quá trình lên men theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Để tăng tối đa hiệu suất, enzym có thể được biểu hiện ở sinh vật chủ thích hợp như *Bacillus*, *Pichia* hoặc *Aspergillus* sp., như *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus oryzae*. Enzym này có thể thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng các phương pháp đã biết, như kết tủa amoni sulfat hoặc etanol, chiết axit, hoặc sắc ký trao đổi anion hoặc cation. Phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) có thể được sử dụng để tinh chế.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến đồ uống có thể nhận được nhờ quy trình như được bộc lộ ở đây. Thuận lợi khi phát hiện ra rằng đồ uống theo sáng chế ổn định, nghĩa là ít bị vẩn đục hơn trong quá trình bảo quản so với đồ uống được sản xuất bằng cách sử dụng chỉ riêng proteaza đặc hiệu prolin hoặc chỉ riêng polyphenoloxidaza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Endoproteaza đặc hiệu prolin thu được từ *A. niger*

Mẫu endoproteaza đặc hiệu prolin thu được từ *A. niger* hiện đang được bán trên thị trường là Brewers Clarex™ (5 PPU/g sản phẩm) được sử dụng. Hoạt tính của endoproteaza đặc hiệu prolin được đo trên peptit tổng hợp Z-Gly- Pro-pNA ở

37°C trong dung dịch đệm xitrat/dinatri phosphat có độ pH=4,6.

Sản phẩm phản ứng được theo dõi bằng phép đo quang phổ ở 405nm. Một đơn vị (1PPU) được xác định là lượng enzym giải phóng 1 μ mol p- nitroanilit mỗi phút trong các điều kiện thử nghiệm này.

Polyphenoloxidaza

Laccaza M120 (không dưới 108000 POU/g sản phẩm) là polyphenoloxidaza mua được từ Amano Enzym (Chipping Norton, UK).

Hoạt tính laccasae được đo theo hướng dẫn của Amano (E211: Phương pháp thử nghiệm để đo hoạt tính laccaza = phương pháp P-4AA) bằng cách theo dõi mức tăng độ hấp thụ thuốc nhuộm quinon-imin ở 505nm trong các điều kiện thử nghiệm.

4-amino-antipyrin + phenol + O₂ → thuốc nhuộm quinon-imin + H₂O.

Một đơn vị laccaza (POU) được xác định là lượng enzym có mặt trong 1ml hỗn hợp phản ứng, độ hấp thụ của nó tăng ở tốc độ 0,1 mỗi phút trong các điều kiện thử nghiệm.

Đo độ đục

Độ đục hoặc vẩn đục được đo bằng máy đo độ đục góc kép Haffman's VOS Rota 90/25 hoặc thiết bị tương đương. Hai góc, 90 và 25 độ được ký hiệu là H90 và H25.

Việc hiệu chỉnh thiết bị được thực hiện theo phương pháp Analytica EBC 9.29 có sử dụng chuẩn AEPA-1. Các kết quả của phép đo độ vẩn đục được biểu thị theo đơn vị EBC.

Ví dụ 1: Sự hình thành vẩn đục trong bia được xử lý bằng endoproteaza đặc hiệu prolin, polyphenol oxidaza và hỗn hợp của hai enzym này.

Bia được sản xuất ở quy mô xưởng sản xuất thử. Trong tất cả các thử

nghiệm, bước ngâm chính xác là như nhau. Ở thời điểm bắt đầu lên men, enzym được thêm vào. Brewers Clarex™ và polyphenol oxidaza được sử dụng riêng rẽ làm tham chiếu. Hơn nữa, các hỗn hợp bao gồm Brewers Clarex™ và polyphenol oxidaza được thử nghiệm. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ở nồng độ oxy chuẩn trong hèm rượu bằng 12ppm cũng như ở nồng độ oxy gấp đôi là 24ppm. Bước lên men được nối tiếp là bước ủ lạnh/làm ổn định và sau đó lọc. Sau đó, bia được đóng chai mà không sử dụng PVPP hoặc silic oxit và bảo quản ở 20°C.

Độ vẩn đục của bia được đo ở 20°C và 0°C và sau khi cưỡng bức trong 6 ngày ở 60°C và tiếp đó làm lạnh qua đêm ở 0°C.

Thời hạn sử dụng được đo sau khi bảo quản ở 20°C và 24 giờ làm lạnh ở 0°C trong vài tháng.

Độ đục của bia được đo như nêu trên.

Sau cưỡng bức, bia được trộn với hỗn hợp bao gồm endoproteaza đặc hiệu prolin (Brewers Clarex) và polyphenol oxidaza có độ đục thấp hơn so sánh với bia chỉ được trộn với hoặc endoproteaza đặc hiệu prolin hoặc polyphenol oxidaza.

Ví dụ 2: Sự hình thành vẩn đục trong bia được xử lý bằng endoproteaza đặc hiệu prolin, polyphenol oxidaza và hỗn hợp của hai enzym này.

Bia được sản xuất trên quy mô xưởng sản xuất thử theo quy trình nấu bia chuẩn. Malt Weyermann® Pilsner 100% thu hoạch năm 2013 được sử dụng. Malt này là malt có chất lượng tốt. Sau khi nghiền, malt được chuyển vào bình chuyển hóa dịch ngâm. Malt được chiết bằng cách sử dụng sơ đồ ngâm chuẩn như được thể hiện dưới đây:

62°C, 5 phút,

66°C, 30 phút,

72°C, 20 phút,

bước ngâm dừng lại ở 78°C trong 5 phút.

Sau khi dừng bước ngâm, dịch ngâm sau đó được lọc qua Lautertun và hèm rượu tạo ra được đun sôi. Hạt Hopsteiner® Polaris loại 90 được sử dụng đã được tính trước đến 30 BU.

Sau đun sôi, hèm rượu được làm lạnh. Hèm rượu được sử dụng là 12°P. Mức oxy được đưa đến 12ppm là mức bình thường đối với hèm rượu 12°P. Bước lên men được bắt đầu bằng cách thêm men nấu bia chuẩn. Bước lên men được tiếp tục ở 12°C cho tới khi độ chiết biểu kiến $\leq 3,5\%$. Sau đó, nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ trong phòng để nghỉ diacetyl trong từ 2 đến 3 ngày cho tới khi mức diacetyl có giá trị $< 0,1\text{mg/l}$. Bước tiếp theo kéo dài một tuần ở 0°C. Sau đó, bia được lọc, cacbonat hóa, đóng chai và diệt trùng.

Các thử nghiệm dưới đây được thực hiện:

1. Tham chiếu không thêm enzym
2. Brewers Clarex ở 3g/Hl
3. Laccaza M120 ở 0,3g/Hl
4. Brewers Clarex ở 3g/Hl thêm Laccaza M120 ở 0,3g/Hl Enzym được thêm vào hèm rượu sau khi oxy hóa.

Chai được bảo quản ở 20°C và mỗi tháng độ vẩn đục trong bia được đo ở 20°C và ở 0°C. Đối với phép đo ở 0°C, đầu tiên, chai được bảo quản ở 0°C trong 24 giờ. Tất cả các phép đo độ vẩn đục được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị đo độ đục góc kép Haffman's VOS Rota 90/25 như được mô tả trên đây. Kết quả, như được thể hiện trên Fig1-4, cho biết bia được sản xuất bằng cách sử dụng Brewers Clarex và Laccase M120 có độ vẩn đục thấp hơn trong một khoảng thời gian dài so với độ vẩn đục của bia được sản xuất chỉ bằng cách sử dụng Brewers Clarex hoặc Laccase.

Ví dụ 3: Polyphenol trong bia được xử lý bằng endoproteaza đặc hiệu prolin, polyphenol oxidaza và hỗn hợp của hai enzym này.

Bia được sản xuất ở quy mô xưởng sản xuất thử. Trong tất cả các thử nghiệm bước ngâm chính xác là như nhau. Ở thời điểm bắt đầu lên men, hỗn hợp bao gồm endopoteaza đặc hiệu prolin và polyphenol oxidaza enzym được thêm vào. Chỉ endopoteaza đặc hiệu prolin hoặc chỉ polyphenol oxidaza được thêm vào bước lên men làm tham chiếu. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ở nồng độ oxy chuẩn trong hèm rượu bằng 12ppm cũng như ở nồng độ oxy gấp đôi bằng 24ppm. Bước lên men được tiếp theo là bước ủ lạnh và sau đó lọc.

Bia được phân tích hàm lượng polyphenol.

Bia được sản xuất bằng cách sử dụng hỗn hợp của Brewers Clarex và polyphenol oxidaza có hàm lượng polyphenol thấp hơn trong bia thành phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất đồ uống bao gồm bước thêm proteaza đặc hiệu prolin và polyphenoloxidaza vào đồ uống, và bước chế biến đồ uống.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó đồ uống là bia.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó đồ uống là rượu hoặc nước hoa quả.
4. Quy trình theo điểm 2, trong đó proteaza đặc hiệu prolin và/hoặc polyphenoloxidaza được thêm vào trước, trong hoặc sau bước lên men.
5. Quy trình theo điểm 4, trong đó polyphenoloxidaza được thêm vào trước bước lên men.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó proteaza đặc hiệu prolin có nguồn gốc *Aspergillus* sp..
7. Quy trình theo điểm 6, trong đó proteaza đặc hiệu prolin có nguồn gốc từ *A. niger*.