



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039447

(51)<sup>2006.01</sup> C12N 1/20; C12N 1/16; C12P 7/42; (13) B  
C12P 13/20; C12N 1/14

(21) 1-2019-01684

(22) 05/09/2017

(86) PCT/EP2017/072249 05/09/2017

(87) WO2018/046500 15/03/2018

(30) 16187414.4 06/09/2016 EP

(45) 25/04/2024 433

(43) 26/08/2019 377A

(73) PURAC BIOCHEM BV (NL)

Arkelsedijk 46 4206 AC GORINCHEM, Netherlands

(72) OTTO, Roel (NL); RAMIREZ, Aldana Mariel (VN); EELDERINK, Jenny (VN).

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

(54) MÔI TRƯỜNG LÊN MEN, CHŨNG CÂY CHO MÔI TRƯỜNG LÊN MEN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐỀ THU ĐƯỢC SẢN PHẨM LÊN MEN

(57) Sáng chế đề cập đến môi trường lên men chứa este của axit béo chống lại sự nhiễm khuẩn trong quá trình lên men. Môi trường lên men này chứa:

ơ chất cho sự phát triển của vi sinh vật; và,

làm chất ngoại sinh, thành phần bổ sung, tác nhân kháng khuẩn được chọn từ: lactylat có công thức chung  $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_a O)_b M$  (công thức 1); glyxerol este có công thức chung  $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (công thức 2); và hỗn hợp của chúng, trong đó R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> và M như được nêu trong bản mô tả.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chủng cây cho môi trường lên men, và phương pháp đề thu được sản phẩm lên men.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gram dương trong việc nuôi cấy vi khuẩn gram âm, nấm mốc và nấm men. Cụ thể, sáng chế đề cập đến tác nhân kháng khuẩn mà chứa lactylat, glyxerol este hoặc hỗn hợp của chúng.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Nguy cơ nhiễm trùng với các vi sinh vật khác là một trong những vấn đề phổ biến đối với tất cả các quá trình vi sinh trong đó nuôi cấy thuần được sử dụng. Mỗi nguy hiểm này đặc biệt áp dụng cho các quy trình lên men công nghiệp lớn, trong đó nguy cơ ô nhiễm với các vi sinh vật khác lớn hơn do quy mô của quy trình so với các quy trình lên men trong phòng thí nghiệm.

Trong quá trình lên men, các công nhân đã tìm cách giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm vi khuẩn bằng cách sử dụng các tác nhân kiểm soát vi khuẩn. Các tác nhân này bao gồm, ví dụ, kháng sinh (tự nhiên) và sulphit ở nồng độ không làm ảnh hưởng đến khả năng tồn tại của nấm men nhưng lại ngăn chặn được sự phát triển của vi khuẩn gây ô nhiễm. Chi tiết về các loại tác nhân này được bộc lộ trong tài liệu: Rückle et al., *Hop acids as natural anti-bacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production*, International Sugar Journal 108: 139-147 (2006); và, Limayem et al., *Alternative antimicrobial hop chất đến control potential Lactobacillus contamination in bioethanol fermentations*, Journal of Environmental Science và Health, Part B 46(8): 709-714, (2011).

Ngày nay, vi khuẩn biến đổi gen thường được sử dụng làm chủng sản xuất cho một số sản phẩm lên men. Ví dụ về việc sử dụng *Escherichia coli* có khả năng tạo ra axit R-lactic, như được mô tả trong tài liệu Chang et al. *Homo-fermentative production of D(-) hoặc L(+) lactat in metabolically engineered Escherichia coli RR1*, Applied

and Environmental Microbiology 65(4): 1384-1389 (1999). Mặc dù sinh vật này đã được chứng minh là phát triển trên một môi trường tương đối đơn giản và rẻ tiền, được xác định về mặt hóa học, nhưng nhiều lần quan sát thấy rằng việc nuôi cấy sinh vật này có thể dễ dàng bị nhiễm bệnh. Các chất gây ô nhiễm đường như là bào tử hình thành các vi sinh vật, hoặc các vi sinh vật gram dương. Trong số các vi khuẩn gram dương gây ô nhiễm còn có các vi khuẩn gây bệnh như: *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, các loài *Bacillus* khác nhau, và *Streptococcus*. Các chất gây ô nhiễm là không mong muốn vì chúng có thể làm tổn hại nghiêm trọng đến độ tinh khiết quang của axit lactic và chúng có thể tạo ra các sản phẩm lên men khác và do đó làm giảm năng suất lên men. Do đó, có những lý do chính đáng để ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật này

Mục tiêu của sáng chế là làm ổn định quá trình lên men và cụ thể quan tâm đến hiệu suất lên men sản phẩm.

Hiện nay người ta đã phát hiện ra rằng, việc bổ sung lactylat và/hoặc glyxerol este của các axit béo chuỗi trung bình đặc biệt ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram dương khi nuôi cấy vi khuẩn gram âm hoặc nấm mốc và nấm men. Sau khi bổ sung một lượng hữu hiệu lactylat, glyxerol este hoặc hỗn hợp của chúng, các vi sinh vật sản xuất tiếp tục phát triển trong thiết bị lên men nhưng sự phát triển của vi khuẩn gram dương gây ô nhiễm đã bị ngăn chặn hoặc ức chế. Điều này đảm bảo rằng, quá trình lên men không bị xáo trộn bởi sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn, các sản phẩm phụ không mong muốn và việc sử dụng không hiệu quả các nguồn năng lượng. Nó cũng làm giảm lượng phụ gia cần thiết của các tác nhân kiểm soát ô nhiễm vi khuẩn như kháng sinh.

Lactylat là este chỉ hợp chất có một axyl từ axit béo được gắn vào một (monolactylat) hoặc nhiều phân tử axit lactic (ví dụ, dilactylat v.v..) và proton (H<sup>+</sup>) hoặc cation khác được gắn vào carboxylat cuối cùng. Nhóm axit béo thường chứa mạch hydrocacbon gắn vào nhóm carboxyl ở tận cùng. Mạch hydrocacbon có thể chứa

số lượng nguyên tử carbon khác nhau, và các liên kết giữa các nguyên tử cacbon có thể là bão hòa hoặc không bão hòa.

Lactylat là chất hoạt động bề mặt đã đến. Các chất hoạt động bề mặt này được tạo ra bằng cách phản ứng với axit R-lactic hoặc axit S-lactic hoặc hỗn hợp bất kỳ của hai chất này với một axit béo và đồng thời trung hòa với một bazơ. Lactylat đã được biết đến trong ngành công nghiệp thực phẩm và được sử dụng trong các ứng dụng chăm sóc cá nhân để cải thiện cảm giác da, làm mềm da và giữ ẩm, và để giảm sự dính trong quá trình chuyển đổi từ ướt sang khô sau khi sử dụng sản phẩm. Đã biết rằng, một số loại lactylat có đặc tính kháng khuẩn. US2007/010856 (Cohen et al.) mô tả vết khâu được xử lý bằng *inter alia* lactylat là một hợp chất kháng khuẩn. US2006/062832 (Lopes) mô tả một chế phẩm lau chứa lactylat là một hợp chất kháng khuẩn. WO2004/037177 (Eveready Battery Inc.) mô tả chế phẩm bột hoặc gel cạo râu kháng khuẩn có chứa lactylat làm hợp chất kháng khuẩn.

WO01/06877 (Rhodia) mô tả việc sử dụng lactylat kết hợp với axit hub-long trong thực phẩm; các axit hub-long có hoạt tính chống lại vi khuẩn gram dương và lactylat được đề xuất như là một thành phần bổ sung có thể có trong một loạt các chất nhũ hóa loại dùng cho thực phẩm (trang 6). Việc sử dụng cụ thể lactylat không được minh họa và thực tế là lactylat có hoạt tính riêng biệt chống lại vi khuẩn gram dương không được công nhận trong tài liệu tham khảo này

Cần lưu ý rằng, WO2004/107877 (Purac Biochem BV) mô tả chế phẩm kháng khuẩn chứa hỗn hợp của axit lactic hoặc dẫn xuất của nó và một axit vô cơ. Chế phẩm này được mô tả như là một chất chống vi trùng nói chung. Việc sử dụng chống *Salmonella* và *Escherichia coli* được chỉ định. Trong khi lactylat được coi là dẫn xuất axit lactic có thể, việc sử dụng chúng không được làm rõ thêm. Không có gì trong tài liệu tham khảo này đề cập đến hay gợi ý hiệu quả đặc biệt của lactylat chống lại vi khuẩn gram dương khi so với vi khuẩn gram âm.

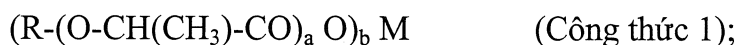
### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất môi trường lên men chứa:

cơ chất cho sự phát triển của vi sinh vật; và,

làm chất ngoại sinh, thành phần bổ sung, tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) lactylat có công thức 1,



ii) glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của các hợp chất này,

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đôi được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

Để hoàn thiện sáng chế, thuật ngữ “hỗn hợp của các hợp chất này” được sử dụng ở đây là để chỉ tác nhân kháng khuẩn có thể chứa: hai hoặc nhiều hợp chất có

Công thức 1; hai hoặc nhiều hợp chất có Công thức 2; hoặc, hỗn hợp của các hợp chất như được xác định trong Công thức 1 và Công thức 2.

Môi trường lên men có thể chứa tác nhân kháng khuẩn với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,5% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,5% trọng lượng, dựa trên tổng trọng lượng của môi trường. Nói cách khác, môi trường lên men có thể chứa tác nhân kháng khuẩn ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000mg/l, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500mg/l và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/l môi trường lên men.

Môi trường lên men còn có thể chứa chủng cấy chứa dịch nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men. Trong khi tạo ra môi trường này, tác nhân kháng khuẩn có thể có thể được thêm vào môi trường trước, sau hoặc cùng với dịch nuôi cấy chứa vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men. Các cách thức thêm này không loại trừ lẫn nhau và sáng chế không loại trừ việc thêm tác nhân kháng khuẩn ở nhiều hơn một giai đoạn lên men.

Tuy nhiên, theo phương án được ưu tiên, môi trường lên men thu được bằng cách: cho cơ chất để nuôi trồng vi khuẩn tiếp xúc với tác nhân kháng khuẩn này trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 phút đến 48 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 24 giờ, trước khi nuôi cấy môi trường lên men bằng vi sinh vật lên men.

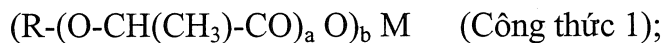
Theo phương án khác, môi trường lên men có thể có thể thu được bằng cách thêm tác nhân kháng khuẩn này vào dòng hơi nước của quy trình tái chế là dòng có nguồn gốc từ sản phẩm của quá trình lên men nhưng được tái chế làm nguồn đầu vào cho môi trường lên men để làm cân bằng nước.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chủng cấy cho môi trường lên men chứa:

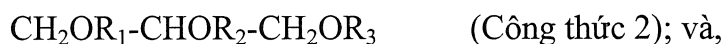
môi trường nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men; và,

tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) lactylat có công thức 1,



ii) glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của các hợp chất này,

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

Mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đôi được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế ngăn ngừa sự nhiễm bẩn của chúng cấy bằng vi khuẩn gram dương. Sau khi cấy môi trường lên men, tác nhân kháng khuẩn sẽ trở nên phân tán trong môi trường mà nó tiếp tục ngăn ngừa hoặc ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gram dương mà có thể được coi là chất ô nhiễm cho môi trường.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng tác nhân kháng khuẩn để ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gram dương gây ô nhiễm trong việc nuôi cấy vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men, tác nhân kháng khuẩn này được chọn từ: lactylat có công thức 1, như được xác định ở trên; glyxerol este có công thức 2, như được xác định ở trên; hoặc, hỗn hợp của các hợp chất này.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm tình trạng nhiễm vi khuẩn gây ra bởi vi khuẩn gram dương trong thùng nuôi cấy lên men vi khuẩn gram âm, phương pháp này bao gồm việc thêm vào môi trường nuôi cấy lượng hữu hiệu tác nhân kháng khuẩn được chọn từ: lactylat có công thức 1, như được xác định ở trên; glyxerol este có công thức 2, như được xác định ở trên; và, hỗn hợp của các hợp chất này.

Và, theo khía cạnh cuối cùng, sáng chế đề xuất phương pháp để thu được sản phẩm lên men, phương pháp này như được xác định trong Yêu cầu bảo hộ và bao gồm các bước: tạo ra môi trường lên men; và, đưa vào môi trường này chủng cấy chứa dịch nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

#### **Định nghĩa**

Thuật ngữ "bao gồm" được sử dụng ở đây sẽ được hiểu nghĩa là phân liệt kê ra sau đó là không đầy đủ và có thể hoặc không bao gồm phần phù hợp bổ sung bất kỳ khác, ví dụ một hoặc nhiều đặc điểm, hợp phần, thành phần, và/hoặc nhóm thể nếu thích hợp.

Hoạt tính hay tác nhân "kháng khuẩn" ở đây có nghĩa là hoạt tính hoặc tác nhân mà có khả năng giết chết và/hoặc ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn.



Thuật tính hshut tính hoặc tác nhân mà ” đư tính hoặc tác n có nghĩa tiêu chuc nhân mà clà, “s “nghĩa tiêu chuc nhân màn” là đghĩa tiêu chuc nhân màncó khả năng giết chết và/hoặc ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn. : tạo ra môi trường lên men;

Thuật ngữ "môi trường lên men" được sử dụng ở đây có nghĩa là hệ ba pha (rắn-lỏng-khí) được giữ lại trong bình lên men. Pha lỏng chứa nước, chất dinh dưỡng hòa tan, cơ chất hòa tan cho sự phát triển của vi sinh vật và các chất chuyển hóa hòa tan; nguồn nước không bị giới hạn và bao gồm, cụ thể là các loại nước xử lý, chẳng hạn như nước thải và/hoặc chất lỏng loãng, nước lọc, nước ngưng tụ trong thiết bị bay hơi hoặc chưng cất, nước thoát ra từ nước bước cất, hoặc nước xử lý sản phẩm lên men khác. Pha rắn bao gồm các tế bào riêng lẻ, viên tròn, cơ chất không hòa tan cho sự tăng trưởng của vi khuẩn và các sản phẩm chuyển hóa kết tủa.

Về thuật ngữ sự tăng trưởng của vi sinh vật, thuật ngữ cơ chất là để chỉ cơ chất hoặc hợp chất bất kỳ được chuyển hóa hoặc có nghĩa là được chuyển hóa thành hợp chất khác do tác động của enzym. Thuật ngữ “cơ chất” không chỉ nhằm để chỉ hợp chất mà tạo ra nguồn cacbon thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu ban đầu, như carbohydrat bất kỳ có nguồn gốc sinh khối, mà để chỉ cả các chất chuyển hóa trung gian được sử dụng trong con đường trao đổi chất liên quan đến vi sinh vật. Môi trường lên men thường có thể bao gồm, như cơ chất, một hoặc nhiều carbohydrat lên men, như đường.

Môi trường lên men, bao gồm cơ chất lên men và các nguyên liệu thô khác được sử dụng trong quá trình lên men của sáng chế có thể được xử lý - bằng cách nghiền, hóa lỏng, đường hóa hoặc các quá trình tương tự - trước hoặc đồng thời với quá trình lên men. Theo đó, môi trường lên men có thể là môi trường trước khi vi sinh vật lên men được thêm vào, chẳng hạn như môi trường trong hoặc thu được từ việc hóa lỏng và/hoặc đường hóa, cũng như môi trường bao gồm các sinh vật lên men, như môi trường được sử dụng trong quá trình đường hóa và lên men đồng thời (SSF) hoặc các quá trình lên men một bước. Để hoàn thiện, trong phương án được đề cập ở trên, trong đó chất kháng khuẩn được thêm vào môi trường lên men trước khi nuôi cấy vi

sinh vật, điều này bao gồm việc bổ sung tác nhân nói trên trong quá trình hóa lỏng và/hoặc đường hóa.

Thuật ngữ "bình lên men" được sử dụng ở đây có nghĩa là bình trong đó phản ứng lên men được thực hiện. Thuật ngữ "thiết bị lên men" có thể có thể được sử dụng thay thế cho bình lên men.

Như được sử dụng ở đây "chủng cấy" có nghĩa là nguồn ban đầu của quần thể vi sinh vật phức tạp được dự định để thêm vào bình lên men, nhưng không làm giới hạn thành phần cuối cùng của quần thể vi sinh vật này; thành phần cuối cùng được xác định bởi các điều kiện hoạt động và năng suất của bình lên men. Chủng cấy thường được hình thành bằng cách nhân giống (các) vi sinh vật mong muốn trong thùng nhân giống phù hợp, thùng này nhỏ hơn nhỏ hơn nhiều so với bình lên men.

Chủng cấy thường bao việc nuôi cấy một hoặc nhiều "chủng sản sinh" của các loại vi sinh vật mà có thể được điều chỉnh bằng cách chọn lọc tự nhiên hoặc bằng phương pháp công nghệ sinh học để tạo ra sản phẩm lên men đang được quan tâm. Một ví dụ điển hình, nhưng không làm giới hạn, chủng cấy bao gồm nuôi cấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae* để tạo ra etanol.

Thuật ngữ "nuôi cấy" được sử dụng theo cách được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu thị sự nhân giống của các vi sinh vật, cụ thể là các chủng sản xuất, trong một môi trường nuôi cấy được xác định trước có lợi cho sự phát triển của chúng. Như được sử dụng trong tài liệu này, "chủng nuôi cấy trong thiết bị lên men", là để chỉ việc nhân giống một hoặc nhiều chủng sản sinh của vi sinh vật có trong môi trường lên men nói trên hoặc bằng chủng cấy thích hợp cho môi trường lên men này.

Không nhằm làm giới hạn vi khuẩn gram âm mà có thể được nuôi cấy và được sử dụng trong sáng chế làm chủng sản sinh. Ví dụ tiêu biểu, nhưng không làm giới hạn, vi khuẩn gram âm bao gồm: *Escherichia coli*; *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Franciscella*;

*Helicobacter; Klebsiella; Legionella; Moraxella; Neisseria; Pantoea; Pasteurellaceae*, vi khuẩn đặc hiệu của giống *Actinobacillus*, giống *Hemophilus* và giống *Pasteurella; Pseudomonas; Proteus; Salmonella; Selenomonadales*, vi khuẩn đặc hiệu của *Propionispira*, giống *Propionispora* và *Schwartzia; Serratia; Shigella; Treponema; Vibrio; Yersinia*; và, *Zynomonas*. Theo phương án được ưu tiên, chủng nuôi cấy trong thiết bị lên men hoặc môi trường lên men bao gồm một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm được chọn từ nhóm bao gồm: *Escherichia coli*; loài *Pseudomonas*; và, loài *Pasteurellaceae*.

Nấm mốc tiêu biểu mà có thể được nhắc đến là nấm mốc có giống: *Aspergillus*, cụ thể *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* và *Aspergillus niger*; *Rhizopus*, for instance *Rhizopus oligosporus* và *Rhizopus oryzae*; *Fusarium*, như *Fusarium oxysporum*; *Mucor*, như *Mucor racemosus*; *Cladosporium*, như *Cladosporium herbarum*; *Penicillium*, như *Penicillium expansum*; và, *Trichoderma*, như *Trichoderma harzanium*.

Ví dụ không làm giới hạn về giống nấm men mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm: *Brettanomyces; Candida; Dekkera; Pichia*; và, *Saccharomyces*.

Carbohydrat mà một vi sinh vật cụ thể có thể lên men thường được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể dễ dàng truy cập trong các tài liệu cơ bản được công bố. Để hoàn thiện, carbohydrat thông thường có thể lên men bằng các vi sinh vật sản sinh axit lactic bao gồm nhưng không giới hạn ở: các loại đường C<sub>5</sub> như arabinoza, xyloza và riboza; các loại đường C<sub>6</sub> như glucoza, fructoza, galactoza, rhamnoza và mannoza; và, các loại đường C<sub>12</sub> như sucroza, maltoza và isomaltoza.

Carbohydrat lên men chủ yếu có nguồn gốc từ nguyên liệu dựa trên tinh bột hoặc đường. Ví dụ về nguyên liệu này bao gồm, nhưng không giới hạn ở: ngô, lúa mì, lúa mì đen, lúa mạch, sắn, lúa mạch đen, dòng tinh bột được phân loại từ các nguyên liệu nêu trên, mía, củ cải đường, mật mía, rom, khoai tây, chất thải từ gỗ, cỏ bụi, thông

và các dẫn xuất gỗ khác, chất thải đô thị, chất thải thực phẩm và chất thải công nghiệp đồ uống (có cồn và không cồn). Nguyên liệu tiêu biểu, nhưng không giới hạn, cho quá trình lên men của *Saccharomyces cerevisiae* là mật mía. Nếu muốn, hàm lượng carbohydrat lên men trong sinh khối có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phần mô tả đặc biệt mang tính hướng dẫn là trong tài liệu của Milne và các đồng tác giả, *Sourcebook of Methods of Analysis for Biomass Conversion and Biomass Conversion Processes*. SERI/SP-220-3548, Golden, CO: Solar Enrgy Research Institute, February 1990.

Ví dụ tiêu biểu, nhưng không làm giới hạn các sản phẩm lên men mà có thể được tạo ra bởi vi khuẩn gram âm, nấm mốc và nấm men, như các vi sinh vật đã được nêu trên, có thể được nhắc đến là: etanol; 1,3-propandiol; glyxerol; butanol; 1,4-butandiol; arabitol; xylitol; sorbitol; manitol; axetoin; axit axetic; axit propionic; axit 3-hydroxy propionic; axit lactic; axit succinic; axit furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; axit adipic; axit xitric; axit aconitic; axit glutamic; axit itaconic; axit levulinic; axit glutaric; axit aspartic; axit malonic; glyxin; serin; threonin; lysin; isopren; và, polyhydroxybutyrat. Theo một phương án, môi trường lên men bao gồm tác nhân kháng khuẩn như được xác định trong sáng chế có thể là để tạo ra: etanol; 1,3-propandiol; glyxerol; butanol; 1,4-butandiol; arabitol; xylitol; sorbitol; manitol; axit axetic; axit propionic; 3-hydroxy axit propionic; axit lactic; axit succinic; 2,5-axit furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; axit adipic; axit xitric; axit aconitic; axit glutamic; axit itaconic; axit levulinic; axit glutaric; axit aspartic; axit malonic; và, hỗn hợp của chúng.

Đã thu được kết quả tốt khi tác nhân kháng khuẩn được thêm vào môi trường lên men để tạo ra: 1,4-butandiol; axit propionic; axit 3-hydroxypropionic; axit lactic; axit succinic; axit 2,5-furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; hoặc axit itaconic. Và nó được ưu tiên nhất để sử dụng tác nhân kháng khuẩn nói trên trong môi trường lên men để tạo ra: axit propionic; axit lactic; axit succinic; 1,4-butandiol; hoặc, axit 2,5-furandicarboxylic. Để hoàn thiện, khi axit lactic thu được là sản phẩm lên men,

sáng chế cũng bao gồm: nhị trùng hóa axit lactic đó để thu được lactit; tổng hợp axit polylactic bằng cách đa trùng ngưng axit lactic này; và, tổng hợp axit polylactic bằng cách polyme hóa lactit thu được từ axit lactic đó.

Người ta nhận ra rằng, sản phẩm lên men mong muốn được đề cập ở đây và có thể thu được bằng cách lên men cơ chất có thể lên men được bằng vi sinh vật thích hợp, sẽ được tạo ra như một thành phần của chế phẩm thường bao gồm thêm: vết của cơ chất có thể lên men; các chất khác được sinh ra do vi sinh vật; và, vết của chính vi sinh vật như mảnh vụn tế bào và/ hoặc các thành phần tế bào. Thuật ngữ “sản phẩm lên men” là nhằm mục đích bao gồm cả sản phẩm thô và sản phẩm sau khi đã được tinh lọc, tinh chế và/hoặc cô đặc. Các phương pháp tinh chế tiêu biểu, nhưng không giới hạn bao gồm một hoặc nhiều phương pháp sau đây: lọc, bao gồm cả vi lọc và siêu lọc; chưng cất; (tái) kết tinh; chiết; xử lý hóa học, như axit hóa; trao đổi ion; xử lý bằng than hoạt tính; và điện phân

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, vi khuẩn gram dương được nhuộm màu xanh đậm hoặc tím bằng cách nhuộm gram, chủ yếu là do một lượng lớn peptidoglycan trong thành tế bào của chúng. Sáng chế liên quan đến việc ức chế hoặc ngăn ngừa sự tăng trưởng của vi khuẩn như vậy trong môi trường nuôi cấy lên men. Sáng chế đặc biệt quan tâm đến việc ức chế hoặc ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn gram dương bao gồm: *Enterococci*; *Clostridium*, cụ thể *Clostridium perfringens* và *Clostridium pasteurianum*; *Listeria*, cụ thể *Listeria monocytogens* và *Listeria innocua*; *Staphylococcus*, cụ thể *Staphylococcus aureus*; các loài *Bacillus*, cụ thể *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* và *Bacillus subtilis*; và, *Streptococcus*.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhóm axyl” có nghĩa là nhóm chức thu được từ việc loại bỏ nhóm hydroxyl ra khỏi axit carboxylic và nó công thức  $R_xCO-$  trong đó  $R_x$  là nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl được gắn vào nhóm CO bằng một liên kết đơn. Một hoặc nhiều liên kết chưa bão hòa có thể có mặt trong nhóm alkenyl. Tổng số nguyên tử cacbon trong mạch axyl sẽ là số nguyên tử cacbon trong mạch  $R_x$  chain + 1, Thuật ngữ (C4-C18)axyl có nghĩa là nhóm axyl có 4-18 nguyên tử cacbon.

Như được sử dụng ở đây, glyxerol este chỉ mang một mạch nhánh của nhóm C4-C18 axyl được gọi là *(C4-C18)glyxerol mono-este*; glyxerol este mà mang hai Nhóm C4-C18 axyl được gọi là *(C4-C15)glyxerol di-este*. Hỗn hợp của các este này có thể được gọi là *(C4-C18)glyxerol mono/di-este* hoặc *(C4-C18)glyxerol mono/di*.

Nhóm axyl tiêu biểu bao gồm: các nhóm axyl C6 như các nhóm iso-hexanoyl; các nhóm axyl C8 như các nhóm iso-octanoyl; các nhóm axyl C10 như các nhóm decanoyl; các nhóm axyl C12 như lauryl (dodecanoyl); các nhóm axyl C14 như các nhóm myristyl (tetradecanoyl); các nhóm axyl C16 như các nhóm xetyl và palmityl (hexadecanoyl); và, các nhóm axyl C18 như octadecanoyl.

Nói chung, các hợp chất được xác định trong Công thức 1 và Công thức 2 ở trên được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gram dương gây ô nhiễm trong việc nuôi cấy vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men nhờ việc thêm một hoặc nhiều hợp chất này vào môi trường nuôi cấy. Khi ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gram dương gây ô nhiễm, có thể cải thiện sự hình thành sản phẩm lên men mong muốn.

Sáng chế loại trừ việc thêm hai hoặc nhiều hợp chất có Công thức 1 hoặc hai hoặc nhiều hợp chất có Công thức 2 làm tác nhân kháng khuẩn, Hơn nữa, hỗn hợp của các hợp chất như được xác định trong Công thức 1 và Công thức 2 cũng có thể được sử dụng.

Tổng lượng tác nhân kháng khuẩn được sử dụng cho môi trường lên men, chủng cấy hoặc thiết bị lên men nuôi cấy là lượng sao cho hữu hiệu đến ức chế, ngăn ngừa hoặc làm giảm sự ô nhiễm gây ra bởi vi khuẩn gram dương. Lượng chính xác tác nhân kháng khuẩn sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố như tác nhân cụ thể được sử dụng, chủng sản sinh được nuôi cấy, loại môi trường và nguồn năng lượng. Tuy nhiên, trong hầu hết các phương án, môi trường lên men hoặc môi trường nuôi cấy khác sẽ chứa từ 0,001 đến 0,5% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,5% trọng

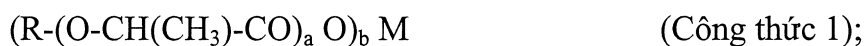
lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của môi trường, của tác nhân kháng khuẩn xác định.

Ngoài các tác nhân kháng khuẩn nêu trên, dựa trên lactylat và/hoặc glyxerol este, môi trường lên men có thể chứa ít nhất một thành phần kháng khuẩn bổ sung có hiệu quả chống lại vi khuẩn gram dương nhưng không ảnh hưởng đáng kể đến vi khuẩn gram âm. Các thành phần bổ sung này có thể được thêm trực tiếp vào môi trường lên men như một thành phần ngoại sinh. Ngoài ra hoặc theo cách khác, các thành phần bổ sung có thể được chứa trong chủng cấy cho môi trường lên men.

Theo một phương án, môi trường lên men, chủng cấy hoặc thiết bị lên men nuôi cấy có thể chứa tối đa đến 1% trọng lượng, dựa trên tổng trọng lượng của môi trường, tác nhân kháng khuẩn bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm: lysozym; nisin; pedioxin;  $\epsilon$ -Polylysin; Protamin; axit Hop beta; axit rosin; axit pimelic; axit benzoic; axit *p*-hydroxybenzoic; axit salixylic; axit xinamic; axit xitric; axit béo bão hòa có chiều dài mạch nằm trong khoảng từ 8 đến 16 nguyên tử cacbon; este đường của axit béo bão hòa có chiều dài mạch trong khoảng từ 8 đến 16 nguyên tử cacbon; và, hỗn hợp của chúng. Nói cách khác, môi trường lên men có thể chứa tối đa đến 2000mg/l tác nhân kháng khuẩn bổ sung nêu trên.

#### Công thức 1

Lactylat được sử dụng trong sáng chế có công thức 1 dưới đây:



R là nhóm C4-C18 axyl, tốt hơn là nhóm axyl C8-C14, tốt hơn nữa là nhóm axyl C10-C14 và tốt nhất là nhóm axyl C12-C14.

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đối được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý

được thế bằng một hoặc nhiều nhóm hydroxyl. Tốt hơn là M được chọn từ nhóm bao gồm Na, K, Ca và Mg. Tốt hơn nữa là, M là Na.

Nhóm (O-CH(CH<sub>3</sub>)-CO)O là gốc lactyl có cấu hình R hoặc S (như được xác định trong Phần E trong bản xuất bản năm 1979 của tài liệu IUPAC *Nomenclature of Organic Chemistry*) có nguồn gốc từ axit R- hoặc S- lactic. Nhóm cũng có thể nữa là hỗn hợp của các cấu hình stereo-isomeric này.

Giá trị của b là bằng hóa trị của M. “b” theo đó sẽ thu được giá trị 1 nếu M là proton (H<sup>+</sup>) hoặc cation hóa trị một như Na, K, Ag, amoni (NH<sub>4</sub>) hoặc amoni được thế. “b” sẽ thu được giá trị của 2 nếu M là cation hóa trị hai như Ca, Mg, Zn, Mn, Fe(II) hoặc Cu.

Giá trị của “a” có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 3, với 1 là được ưu tiên. Lactylat trong đó “a” là 1 được gọi là monolactylat; hợp chất trong đó “a” là 2 được gọi là dilactylat; và, hợp chất trong đó “a” là 3 được gọi là trilactylat. Monolactylat (a=1) được ưu tiên để sử dụng trong sáng chế này. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng khi monolactylat được chứa trong tác nhân kháng khuẩn, sẽ không loại trừ sự có mặt của một lượng vết dilactylat và trilactylat có trong đó; loài có bậc cao hơn có thể phát sinh trong quá trình tổng hợp monolactylat.

Lactylat Công thức 1 tiêu biểu mà có tác dụng làm tác nhân kháng khuẩn trong sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat); tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat); hexadecanoyl-lactylat (C16-lactylat); octadecanoyl lactylat (C18:0-lactylat) và, octadec-9-enoyl-lactylat (C18:1-lactylat).

Phương pháp tổng hợp các lactylat này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể nhắc đến các tài liệu: Patent Mỹ số US 3,883,669 (Tsen et al.); Patent Mỹ số US 4,146,548 (Forsythe); Elliger, *A convenient preparation of pure stearoyl-2-lactylic acid*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 527 (1979); và, Công bố đơn quốc tế số WO 2012/036693 (Caravan Ingredients Inc.). Ngoài ra, lactylat thô thu



được từ các phương pháp tổng hợp này có thể được tinh chế bằng các phương pháp thông thường, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: lọc; ly tâm; cất; kết tinh; chiết; và, sắc ký.

## Công thức 2

Glyxerol este thích hợp để sử dụng làm tác nhân kháng khuẩn trong sáng chế là được xác định trong Công thức 2:



mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl.

Theo phương án thứ nhất, một hoặc hai trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là nhóm C6-C14 axyl và nhóm  $R_n$  còn lại là H. Tốt hơn là, một hoặc hai trong số  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  là C8 các nhóm axyl và nhóm còn lại  $R_n$  là H.

Cần lưu ý rằng, sáng chế không loại trừ việc sử dụng hỗn hợp của glyxerol mono- và di-este cùng với tác nhân kháng khuẩn. Ví dụ, sẽ thu được kết quả tốt từ việc sử dụng (C8)glyxerol mono/di-este.

Phương pháp tổng hợp mono- và di-este này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp tổng hợp thương mại C4-C18 este của glyxerol thường được thực hiện bằng hai cách khác nhau: este hóa trực tiếp axit béo bằng glyxerol (*glyxerolysis*), được xúc tác bằng axit đồng nhất, như axit sulphuric hoặc sulfonic; hoặc, bằng cách chuyển este hóa triglyxerit và đa rượu được xúc tác bằng hydroxit kiềm như NaOH, KOH hoặc  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  và muối natri của rượu có khối lượng phân tử thấp, như metanol. Còn có thể tham khảo tài liệu: Mostafa et al. *Production of mono-, di-, and triglyceride from waste fatty acids through esteification with glycerol* Advances in Bioscience và Biotechnology, 2013, 4, 900-907; Hyun et al. *A single step non-catalytic esteification of palm fatty acid distillate (PFAD) for biodiesel*

*production. Fuel*, 93, 373-380 (2012). Ngoài ra, glyxerol este thô thu được theo các phương pháp tổng hợp này có thể được tinh chế bằng các phương pháp thông thường, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: lọc; ly tâm; cất; kết tinh; chiết; và, sắc ký.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế sẽ được minh họa tiếp bằng các Ví dụ sau đây, các Ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa cho sáng chế, mà không nhằm làm giới hạn nó.

AMCET 200C: hỗn hợp C8-glyxerol mono- và dieste, mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.

AMCET 3400E: Hỗn hợp của decanoyl-lactylat (C10-lactylat) và dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat, mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.A.

AMCET 4530E: Hỗn hợp của dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat) và tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat), mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.A.

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, U.S.A.

Bioscreen C: Hệ nuôi cấy có được từ Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland. Bioscreen C xác định được về mặt động lực sự phát triển của độ đục (tăng trưởng) bằng phép trắc quang theo chiều dọc tối đa đến 200 lỗ đồng thời.

EMPLEX: C18-lactylat, mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.

MIC: (*Minimal Inhibitory Concentration*: Nồng độ ức chế tối thiểu), như được xác định trong phép thử nghiệm mật độ quang, là nồng độ thấp nhất mà tại đó mức gia tăng độ hấp thụ của chủng nuôi cấy không vượt quá giá trị ngưỡng, được định nghĩa là

mức tăng trung bình của giá trị độ hấp thụ của mẫu trồng cộng với ba lần độ lệch chuẩn.

Olacta: Octadecenoyl-lactylat (C18:1-lactylat) mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.A.

Pationic 122A: Hỗn hợp của 2 lactylat, cụ thể là natri decanoyl lactylat (natri caproyl lactylat) và natri dodecanoyl lactylat (natri lauroyl lactylat) với tỷ lệ 1,3:1 mol, mua được từ Công ty Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.A.

Ví dụ 1: Tác dụng của tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat) lên chủng nuôi cấy hỗn hợp gồm *Escherichia coli* và *Clostridium pasteurianum*

Để xác định xem liệu tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat) có thể ngăn ngừa *Clostridium pasteurianum* JEG2 (NCCB 100154, NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria, Utrecht, Netherlands) sự tăng trưởng trong dịch nuôi cấy của *Escherichia coli* TG128 tạo ra axit homolactic R-lactic kỹ thuật sinh học (NRRL B-30962, NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, U.S.A.), ba cách lên men khác nhau được thiết lập và được thực hiện đồng thời. Các phương pháp lên men đó là:

- i) Thiết bị lên men 1: *Escherichia coli* TG128 lên men nuôi cấy tinh khiết;
- ii) Thiết bị lên men 2, *Escherichia coli* TG128 được trộn với *Clostridium pasteurianum* JEG2;
- iii) Thiết bị lên men 3, *Escherichia coli* TG128 được trộn với *Clostridium pasteurianum* JEG2 kèm theo thêm 0,05% (trọng lượng/thể tích) tetradecanoyl-lactylat (C<sub>14</sub>-lactylat: Corbion Caravan, Lenxa, Kansas, U.S.A.).

Tất cả ba phương pháp lên men này được thực hiện trong thiết bị lên men dung tích 7 lít vô trùng. Thiết bị lên men 1, 2 và 3 nhận được 3,5 lít môi trường sinh

trưởng vô trùng chứa thành phần sau: 3,25 lít nước khử khoáng, 385g glucoza monohydrat, 12,25g di-amoni phosphat, 17,75g di-kali hydro phosphat, 12,25g kali dihydro phosphat, 3,5ml dung dịch 1M chứa betain-hydroclorua, 5,25ml dung dịch 1M chứa  $MgSO_4$  (magie sulphat), 3,5ml dung dịch 1M chứa  $CaCl_2$  (canxi clorua) và 5,25ml dung dịch vết kim loại. Dung dịch thành phần vết chứa trong mỗi lít: 1,6g  $FeCl_3$  (sắt(III)-clorua), 0,2g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (coban-clorua), 0,1g  $CuCl_2$  (đồng-clorua), 0,2g  $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$  (kẽm-clorua) 0,2g  $NaMoO_4$  (natri-molybdat),  $H_3BO_3$  (axit boric) và 10ml 37% (trọng lượng) HCl (axit clohydric). Thiết bị lên men 3 nhận được 0,05% (trọng lượng/thể tích) tetradecanoyl-lactylat ( $C_{14}$ -lactylat).

Tất cả 3 thiết bị lên men được trang bị đầu dò pH. Độ pH của quá trình lên men được kiểm soát ở mức 6,5 bằng cách thêm huyền phù đặc của  $Ca(OH)_2$  trong nước khử khoáng. Nồng độ của huyền phù đặc  $Ca(OH)_2$  là khoảng 220 g/l. Nhiệt độ của thiết bị lên men được giữ không đổi ở 37°C.

Mỗi thiết bị lên men (1, 2 và 3) được cấy bằng 80ml chủng nuôi cấy tăng trưởng tích cực qua đêm *Escherichia coli* TG128. Thiết bị lên men 2 và 3 cũng được cấy bằng 1ml dịch nuôi cấy của *Clostridium pasteurianum* JEG2 tăng trưởng trên canh trường truyền não tim. Tùy thuộc vào quy trình lên men, việc nuôi cấy trong thiết bị lên men được vận hành trong khoảng từ 25 đến 35 giờ, sau đó chúng được phân tích. Kết quả của phép phân tích (hóa học) được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

	Thiết bị lên men 1	Thiết bị lên men 2	Thiết bị lên men 3
Thành phần (g/l)	<i>Escherichia coli</i> TG128	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Costridium pasteurianum</i> NCCB 100154	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Clostridium pasteurianum</i> NCCB 100154 + Tetradecanoyl-lactylat
R-lactat	82,6	28,2	81,8
S-lactat	0	2	0,3
% lượng dư đồng phân đối ảnh: (R-S)/(R+S)	100	86,8	99,3
Etanol	0,07	0,4	0,08
glucoza	1,9	14,4	2,3
Axit formic	< 0,2	2	< 0,2
Axit axetic	0,2	2,3	0,3
Axit propionic	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Axit butyric	< 0,1	6,6	0,1
Axit pyruvic	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Axit 2-hydroxy butyric	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Axit glycolic	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Axit oxalic	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Axit sorbic	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Axit fumaric	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Axit succinic	0,1	< 0,1	< 0,1
Axit benzoic	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Axit maleic	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Axit malic	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Axit xitric	< 0,5	< 0,5	< 0,5

12 giờ sau khi cấy, người ta quan sát thấy Thiết bị lên men 2 bắt đầu tạo ra một khối lượng lớn bọt và có mùi thối. Kiểm tra bằng kính hiển vi canh trường nuôi cấy này cho thấy sự có mặt của một số lượng lớn các tế bào mang nội bào tử. Hiện tượng này được nhìn thấy khi *Clostridium pasteurianum* JEG2 đang ăng trưởng không giới hạn.

Thiết bị lên men 3 cũng được cấy bằng chủng nuôi cấy hỗn hợp gồm *Escherichia coli* TG128 và *Clostridium pasteurianum* JEG2 nhưng cũng nhận được 0,05% (trọng lượng/thể tích) tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat) không tạo ra bọt hoặc mùi thối. Hơn nữa, kiểm tra bằng kính hiển vi canh trường nuôi cấy lấy từ Thiết bị lên men 3 này cho thấy nó không chứa tế bào mang nội bào tử.

Hiệu suất của Thiết bị lên men 3 ở mọi khía cạnh tương tự như hiệu suất của Thiết bị lên men 1 được cấy bằng chủng nuôi cấy nguyên chất *Escherichia coli* TG128. Hơn nữa, phân tích hóa học của canh trường lên men (Bảng 1) cho thấy không có sự khác biệt về thành phần tạp chất giữa quá trình lên men tiêu chuẩn *Escherichia coli* TG128 (Thiết bị lên men 1) và lên men bằng chủng nuôi cấy hỗn hợp *Escherichia coli*/*Clostridium pasteurianum* JEG2 với tetradecanoyl-lactyl. Phần trăm lượng dư đồng phân đối ảnh của lactat được sinh ra trong Thiết bị lên men 1 và 3 là gần 100 và chỉ một lượng nhỏ S-lactat được phát hiện trong Thiết bị lên men 3, có thể được đưa vào bằng cách xà phòng hóa este lactylat.

Mặt khác, phần trăm lượng dư đồng phân đối ảnh trong Thiết bị lên men 2 thấp hơn đáng kể do sự tăng trưởng không hạn chế của *Clostridium pasteurianum* JEG2. Hơn nữa, tổng lượng axit lactic được tạo ra trong Thiết bị lên men 2 cũng thấp hơn đáng kể. Phần trăm lượng dư đồng phân đối ảnh được định nghĩa là:  $((R-S)/(R + S)) * 100$  và trong đó R và S là các phân đoạn tương ứng của chất đồng phân đối ảnh trong canh trường lên men chứa R- và S-lactat.

Một cách chính xác, các kết quả tương tự đã đạt được khi Thiết bị lên men 3 được củng cố thêm bằng 0,025% (trọng lượng/thể tích) tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylate) thay vì 0,05% (trọng lượng/thể tích).

Ví dụ 2: Tác dụng của hỗn hợp của decanoyl-lactylat (C10-lactylat) và dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat) hoặc hỗn hợp của dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat) và tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat) lên chủng nuôi cấy hỗn hợp gồm *Escherichia coli* và *Clostridium pasteurianum*

Trong thử nghiệm tương tự được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 1, hiệu quả của 0,05% (trọng lượng/thể tích) AMCET 3400E và 0,05% (trọng lượng/thể tích) AMCET 4530E để ức chế sự tăng trưởng của *Clostridium pasteurianum* JEG2 trong dịch nuôi cấy của *Escherichia coli* TG128 được thử nghiệm.

Hiệu suất của Thiết bị lên men 3 với AMCET 3400E hoặc AMCET 4530E về mọi mặt là tương tự như hiệu suất của Thiết bị lên men 1 mà được cấy bằng chủng nuôi cấy nguyên chất *Escherichia coli* TG128, Ngoài ra, phép phân tích hóa học canh trường lên men cho thấy rằng không có sự khác biệt về thành phần tạp chất giữa quá trình lên men tiêu chuẩn *Escherichia coli* TG128 (Thiết bị lên men 1) và lên men bằng chủng nuôi cấy hỗn hợp *Escherichia coli/Clostridium pasteurianum* JEG2 bằng AMCET 3400E hoặc AMCET 4530E (Thiết bị lên men 3). Phần trăm lượng dư đồng phân đối ảnh của lactat được tạo ra Thiết bị lên men 1 và 3 là gần bằng 100 đối với AMCET 3400E và AMCET 4530E.

Ví dụ 3: Thử nghiệm *in vitro* của lactylat chống lại *Clostridium perfringens*

Tác dụng của lactylat như được xác định trong Công thức 1 và glyxerol este như được xác định trong Công thức 2 để ức chế sự tăng trưởng được thử nghiệm chống lại *Clostridium perfringens* ATCC 13124 trong hệ nuôi cấy Bioscreen C.

Mật độ quang của chủng nuôi cấy được xác định tự động ở các khoảng thời gian cố định ở 420 – 580nm sử dụng bộ lọc dải rộng. Tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật thử nghiệm được xác định ở 30°C. Để đảm bảo các điều kiện oxy thấp, Bioscreen được đưa vào bên trong khoang yếm khí được trang bị bộ cảm biến oxy loại M-12 (In Vivo<sub>2</sub> 400 hypoxia workstation, Biotrace International Plc, Bridgend, United Kingdom). Ứng suất oxy được điều hòa ở mức 0% oxy sử dụng modul trộn khí Ruskinn (Biotrace International Plc).

Canh trường truyền cho tim não được chuẩn bị với các lượng khác nhau lactylat và glyxerol este như được chỉ ra trong Bảng 2 dưới đây.

Các hợp chất sau đây được thử nghiệm: Octanoyl-lactylat (C8-lactylat), Decanoyl-lactylat (C10-lactylat), Dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat), Tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat), Hexadecanoyl-lactylat (C16-lactylat), Olacta (octadecenoyl-lactylat, C18:1- lactylat), AMCET 3400E, AMCET 4530E, C8-glyxerol mono/di, C10-glyxerol mono/di, C12-glyxerol mono/di, C14-glyxerol mono/di, axit etradecanoic (axit myristic) và Natri tetradexyl sulfat (Natri myristyl sulfat).



Bảng 2

Loài	Khoảng nồng độ% (trọng lượng/thể tích)	Cỡ bước nồng độ% (trọng lượng/thể tích)
Octanoyl-lactylat (C8-lactylat)	0 – 0,5	0,1
Decanoyl-lactylat (C10-lactylat)	0 – 0,1	0,02
Dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat)	0 – 0,01	0,002
Tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat)	0 – 0,01	0,001
Hexadecanoyl-lactylat (C16-lactylat)	0 – 0,01	0,002
Olacta (Octadecenoyl-lactylat, C18:1-lactylat)	0 – 0,1	0,02
AMCET 3400E (C10/C12-lactylat)	0 – 0,01	0,001
AMCET 4530E (C12/C14-lactylat)	0 – 0,01	0,001
C8- glyxerol mono/di	0 – 0,5	0,05
C10- glyxerol mono/di	0 – 0,1	0,01
C12- glyxerol mono/di	0 – 0,01	0,001
C14- glyxerol mono/di	0 – 0,01	0,001
Axit Tetradecanoic (axit Myristic)	0 – 0,01	0,001
Natri tetradexyl sulfat (Natri myristyl sulfat)	0 – 0,01	0,001

Axit Tetradecanoic (axit Myristic), Natri tetradexyl sulfat (Natri myristyl sulfat) mua được từ Công ty Sigma-Aldrich.

Độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 6,0 bằng dung dịch axit sulphuric 9M sử dụng pH kế Handylab pH 12 được trang bị bộ dò Blueline 16 pH (micro) (No. 285129163). Tất cả môi trường được khử trùng bằng cách lọc sử dụng bộ lọc xenluloza axetat 0,45 $\mu$ m (Minisart bộ lọc xyranh, vô trùng và không sinh nhiệt, No. 16555, Sartorius, Göttingen, Germany) (9). 300 $\mu$ l mỗi môi trường được chuyển sang một panen của đĩa 100 lỗ Bioscreen Honeycombe vô trùng (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland). Đĩa lỗ hoàn thiện được bảo quản ở  $-30^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng tiếp. Đĩa có lỗ được cấy bằng 3 $\mu$ l mầm nuôi cấy sử dụng bộ phân tán lặp lại Hamilton vô trùng (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Mầm nuôi cấy lỏng của *Clostridium perfringens* ATCC 13124 được điều chế trong các ống có nắp ren (100 x 16mm) chứa 10ml canh trường truyền cho tim não (Oxoid CM225, Basingstoke, United Kingdom) trong 24 giờ ở  $30^{\circ}\text{C}$ .

Bảng 3 thể hiện trị số MIC của lactylat, glyxerol este, axit tetradecanoic (axit myristic) và natri tetradexyl sulfat (natri myristyl sulfat) đối với *Clostridium perfringens* ATCC 13124 trong canh trường truyền cho tim não. Trong ngoặc đơn là số lần lặp lại.

Bảng 3. Trị số MIC của các dẫn xuất axit béo khác nhau đối với *Clostridium perfringens* ATCC 13124 trong canh trường truyền cho tim não (Số lần lặp lại được cho trong ngoặc đơn)

Loài	Trị số MIC % (trọng lượng/thể tích)
Octanoyl-lactylat (C8-lactylat)	0,05 (2)
Decanoyl-lactylat (C10-lactylat)	0,04 (2)
Dodecanoyl-lactylat (C12-lactylat)	0,002 (2)
Tetradecanoyl-lactylat (C14-lactylat)	0,001 (2)
Hexadecanoyl-lactylat (C16-lactylat)	0,002 (2)
Olacta (Octadecenoyl-lactylat, C18:1- lactylat)	0,02 (2)
AMCET 3400E (C10/C12- lactylat)	0,02 (3)
AMCET 4530E (C12/C14- lactylat)	0,001 (3)
C8- glyxerol mono/di	0,1 (3)
	0,2 (4)
C10- glyxerol mono/di	0,02 (2)
	0,04 (2)
C12- glyxerol mono/di	>0,01 (2)
C14- glyxerol mono/di	>0,01 (4)
Axit tetradecanoic (Axit myristic)	>0,01 (3)
Natri tetradexyl sulfat (Natri myristyl sulfat)	0,001 (3)

Dường như ngay cả ở nồng độ rất thấp, lactylat và glyxerol este đều có khả năng ức chế sự tăng trưởng của *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

Ví dụ 4: Đặc tính kháng khuẩn của một số lactylat và C8-glyxerol mono/di-este

Tác dụng của một số lactylat khác nhau chọn lọc như được xác định trong công thức 1 và C8-glyxerol mono/di este (Caprylic mono/di) như được xác định trong công thức 2 để ức chế sự tăng trưởng được thử nghiệm chống lại việc chọn lọc vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm trong hệ nuôi cấy Bioscreen C. Mật độ quang của chủng nuôi cấy được xác định tự động ở các khoảng thời gian cố định ở 420 – 580 nm sử dụng bộ lọc dải rộng. Tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật thử nghiệm được xác định ở 30°C.

Canh trường truyền cho tim não được điều chế với lượng thay đổi của lactylat hoặc C8-glyxerol mono/di este (Caprylic mono/di). Các hợp chất sau đây được thử nghiệm: AMCET 3400E; AMCET 4530E; EMPLEX; và, AMCET 200C.

Độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 6,0 bằng dung dịch axit sulphuric 9M sử dụng pH kế Handylab pH 12 được trang bị bộ dò Blueline 16 pH (micro) (no. 285129163). Tất cả môi trường được khử trùng bằng lọc sử dụng 0,45 µm bộ lọc xenluloza axetat (Minisart bộ lọc xyranh, vô trùng và không sinh nhiệt, no. 16555, Sartorius, Göttingen, Germany). 300 µl mỗi môi trường được chuyển sang một panen của đĩa 100 lỗ Bioscreen Honeycombe vô trùng (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland). Đĩa lỗ hoàn thiện được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng tiếp. Đĩa có lỗ được cấy bằng 3µl chủng nuôi cấy thử nghiệm thích hợp sử dụng bộ phân tán lặp lại Hamilton vô trùng (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).

Mầm nuôi cấy lỏng được điều chế từ các chủng nuôi cấy sau đây được sử dụng trong thử nghiệm này:

*Escherichia coli* serotype O157:H7 (ATCC 700728);

*Escherichia coli* (ATCC 8739);

*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P);

*Listeria monocytogens* (F2399);

*Listeria monocytogens* (ATCC 7644);

*Listeria monocytogens* NFPA 83 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002)  
Journal of Food Protection 65(4): 651-658);

*Listeria monocytogens* LCDC 861 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002)  
Journal of Food Protection 65(4): 651-658);

*Listeria innocua* (ATCC 33090);

*Listeria innocua* TNO strain (TNO, Zeist, The Netherlands);

*Salmonella enterica* (ATCC 13076, *S. Enteritidis*);

*Salmonella enterica* (ATCC 13311, *S. Typhimurium*);

*Salmonella enterica* JAVA (NCTC 8458, NCTC: National Collection of Type  
Cultures, Porton Down, Salisbury, United Kingdom);

*Lactobacillus sakei* (DSMZ 20017, DSMZ:Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany);

*Lactobacillus plantarum* (DSMZ 20174);

*Lactobacillus curvatus* (DSMZ 20019);

*Bacillus cereus* (ATCC 11778);

*Pseudomonas lundensis* (LMG 13517, LMG: Belgian Coordinated Collections  
of Microorganisms/ LMG Bacteria Collection, Gent, Belgium); và,

*Pseudomonas fragi* (LMG 2191).

Tất cả các chủng nuôi cấy hàng ngày được chuyển sang ống có nắp vặn (100 x 16 mm) chứa 10ml canh trường truyền cho tim não (Oxoid CM0225, Basingstoke, UK). Loài *Lactobacillus* được chuyển sang canh trường MRS (Oxoid CM0359). Tất cả các chủng nuôi cấy được ủ ở 30°C và không cần khuấy.

Các Tác giả đã nghiên cứu tác dụng của các nồng độ khác nhau của AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX và AMCET 200C.

Dữ liệu, như được tóm tắt trong Bảng 4 và 5 dưới đây, cho thấy rằng vi khuẩn gram dương là nhạy với các hợp chất hơn là vi khuẩn gram âm. Dữ liệu trong Bảng 5 còn cho thấy rằng AMCET 200C là có hoạt tính chống lại một khoảng rộng các sinh vật hơn lactylat và còn bao gồm cả vi khuẩn gram âm. Nồng độ hữu hiệu của AMCET 200C (C8-glyxerol mono/di) chống lại vi khuẩn gram âm là 0,5 – 1% (trọng lượng).

Bảng 4. Tác dụng của AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX và AMCET 200C lên vi khuẩn gram dương và gram âm khác nhau

Chủng	AMCET 3400E (C10/C12- lactylat)	AMCET 4530E (C12/C14- lactylat)	Emplex	AMCET 200C (C8- glyxerol)
<i>Listeria monocytogens</i> LCDC 861	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogens</i> NFPA 83	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogens</i> ATCC 7644	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Chủng <i>Salmonella enterica</i> JAVA	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

Hai khoảng nồng độ được thử nghiệm: 0 – 0,1% (trọng lượng) và 0 – 0,01% (trọng lượng). Trong Bảng 4, các kết quả đối với khoảng nồng độ 0 – 0,01% được thể hiện trong ngoặc đơn. Dấu hiệu A “+” là để chỉ mức ức chế. Vi khuẩn gram dương là *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* và *Lactobacillus*.

Bảng 5. Tác dụng của AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX và AMCET 200C lên các vi khuẩn gram dương và gram âm khác nhau

Chủng	AMCET 3400E (C10/C12- lactylat)	AMCET 4530E (C12/C14- lactylat)	Emplex	AMCET 200C (C8- glyxerol)
<i>Listeria monocytogens</i> F2399	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogens</i> LCD8 861	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogens</i> NFPA 83	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogens</i> ATCC 7644	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	+	+	+
Chủng <i>Listeria innocua</i> TNO	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	NT	NT	NT	+
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	NT	NT	NT	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NT	NT	NT	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	-	-	-	+
Chủng <i>Salmonella enterica</i> JAVA	-	-	-	+
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	NT	NT	NT	-
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	NT	NT	NT	-

Khoảng nồng độ được thử nghiệm: 0 – 1% (trọng lượng). Trong Bảng 5, dấu hiệu “+” là để chỉ mức ức chế, NT: (not tested) không được thử nghiệm. Các vi khuẩn gram dương là *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* và *Lactobacillus*.

Ví dụ 5: Lên men etanol bằng *Saccharomyces cerevisiae*



Ví dụ này cho thấy tác dụng của nồng độ thấp của hỗn hợp lactylat khi lên men etanol bằng *Saccharomyces cerevisiae*, bước lên men này được thực hiện bằng mật mía và bị ô nhiễm từ từ bằng với chủng nuôi cấy hỗn hợp gồm loài *Lactobacillus*.

Chủng nuôi cấy và các điều kiện nuôi cấy

*Saccharomyces cerevisiae* MUCL30115 thu được từ Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgium) và được nuôi cấy sơ bộ trong canh trường nấm men-pepton-glucoza (YPG). Canh trường YPG-broth chứa, trên mỗi lít nước khử khoáng: 40g glucoza monohydrat; 10g Bacto™ Pepton (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA); và, 5g dịch chiết nấm men Bacto™ (Becton, Dickinson và Company, Sparks, Maryland, USA). Độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 6,0 – 7,0 bằng dung dịch HCl1N. Chủng nuôi cấy được ủ trong bình lắc ở nhiệt độ trong phòng.

*Lactobacillus brevis* LMG11438 thu được từ Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG, Gent, Belgium). *Lactobacillus fermentum* AR748 và *Lactobacillus fructivorans* AR742 thu được từ Corbion Purac B.V., Gorinchem, The Netherlands. Tất cả các chủng được nuôi cấy sơ bộ trong canh trường MRS (de Man et al (1960) *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J. Appl. Bacteriology 23(1): 130-135) và được ủ ở 30°C trong bình tĩnh có nắp ren. Chủng nuôi cấy hỗn hợp được điều chế bằng cách trộn các thể tích bằng nhau của ba chủng nuôi cấy *Lactobacillus*.

Tất cả các thử nghiệm lên men được thực hiện trong 3 lít thiết bị lên men thủy tinh có áo nhiệt chứa 0,5 lít môi trường lỏng có thành phần sau: 50g mật mía đường (85oBrix); và, 450ml nước khử khoáng. Nhiệt độ của mỗi quá trình lên men được kiểm soát ở 30° C bằng cách sử dụng bể nước tuần hoàn và độ pH được kiểm soát ở mức 5,5 bằng dung dịch NaOH 1N.

Hai thiết bị lên men chính (A, B) được cấy bằng 50ml chủng nuôi cấy lên men hoạt tính *Saccharomyces*: cả hai chủng nuôi cấy này đều nhận được 10ml chủng nuôi cấy hỗn hợp *Lactobacillus*. 0,5ml dung dịch chứa 10% (trọng lượng) Pationic 122A được thêm vào 1 trong số các thiết bị lên men này (A) để nghiên cứu tác dụng của lactylat trong đó.

Sau 24 giờ lên men, 9-10% thể tích chủng cấy được loại bỏ ra khỏi thiết bị lên men (A, B) và lần lượt được chuyển sang các thiết bị lên men khác (A', B') chứa môi trường mới: quá trình lên men trong thiết bị lên men chính (A, B) được để tiến hành. Bằng cách sử dụng kỹ thuật trượt ngược lại này, 6 đến 8 lần chuyển giao chủng cấy này được thực hiện, mỗi lần 24 giờ sau khi lên men trong thiết bị lên men nguồn.

#### Phương pháp phân tích

Lượng axit lactic L (+), axit lactic D (-) và glucoza dư được xác định bằng cách sử dụng quy trình enzyme. Cụ thể và từng loại theo giao thức của nhà sản xuất đã cho: glucoza được thử nghiệm bằng cách sử dụng bộ kit K-Gluc có sẵn từ Megazyme International; Axit D-lactic được thử nghiệm bằng bộ kit K-Date có sẵn từ Megazyme International; và, axit L-Lactic đã được thử nghiệm bằng bộ kit L-Date có sẵn từ Megazyme International.

Axit hữu cơ và etanol được xác định bằng phân tích sắc ký khí.

#### Kết quả

Bảng 6 dưới đây cho thấy lượng axit lactic L (+), axit lactic D (-) và etanol được xác định trong quá trình lên men đã bị ô nhiễm với chủng nuôi cấy hỗn hợp các loài *Lactobacillus*. Trong các môi trường nuôi cấy lên men *Saccharomyces cerevisiae* cũng chứa Pationic 122A, có sự giảm đáng kể nồng độ của axit lactic (+) L và đặc biệt là axit D (-) lactic so với các môi trường nuôi cấy không chứa hỗn hợp trộn lactylat. Hơn nữa, nồng độ etanol của các môi trường nuôi cấy *Saccharomyces cerevisiae* có chứa Pationic 122A được gia tăng đáng kể so với các môi trường nuôi cấy không có

hỗn hợp trộn lactylat. Tác động tích cực của Pationic 122A có thể được duy trì trong ít nhất 6 - 8 lần chuyển liên tiếp.

Bảng 6

Lên men mật mía bằng <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bị ô nhiễm chủng nuôi cấy hỗn hợp LAB				
Chuyển giao số	Sự có mặt của Pationic 122A	Axit L(+) lactic (g/l)	Axit D(-) lactic (g/l)	Etanol (% trọng lượng)
2	Không	1,40	6,80	1,20
3	Không	1,18	6,50	1,30
4	Không	1,28	6,79	1,60
5	Không	1,16	3,15	1,30
6	Không	1,42	3,31	1,60
Trung bình		1,29	5,31	1,40
Lên men mật mía bằng <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bị ô nhiễm chủng nuôi cấy hỗn hợp LAB và có mặt Pationic 122A				
Chuyển giao số	Sự có mặt của Pationic 122A	Axit L(+)lactic (g/l)	Axit D(-)lactic (g/l)	Etanol (% trọng lượng)
2	Có	0,15	2,10	1,30
3	Có	0,16	0,90	2,10
4	Có	0,15	0,98	2,20
5	Có	0,21	0,97	2,20
6	Có	0,23	1,33	1,80
Trung bình		0,18	1,25	1,92

## YÊU CẦU BẢO HỘ

### 1. Môi trường lên men chứa:

chủng cấy chứa môi trường nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men, trong đó nấm men này được chọn từ giống *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* và *Pichia*;

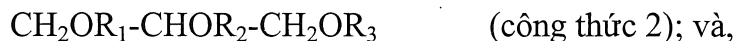
cơ chất cho sự phát triển của vi sinh vật; và,

làm chất ngoại sinh, thành phần bổ sung, tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) ít nhất một lactylat có công thức 1,



ii) ít nhất một glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của i) và ii),

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đối được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

2. Môi trường lên men theo điểm 1, trong đó tác nhân kháng khuẩn là lactylat có công thức 1 hoặc muối của nó.

3. Môi trường lên men theo điểm 2, trong đó R là nhóm axyl có mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 4 đến 18 nguyên tử cacbon.

4. Môi trường lên men theo điểm 3, trong đó R là nhóm axyl có mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 12 đến 14 nguyên tử cacbon.

5. Môi trường lên men theo điểm 4, trong đó “a” trong công thức 1 là 1.

6. Môi trường lên men theo điểm 1, trong đó tác nhân kháng khuẩn là glyxerol este có công thức 2.

7. Môi trường lên men theo điểm 6, trong đó một hoặc hai trong số  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  là các nhóm axyl có 8 nguyên tử cacbon và nhóm còn lại là H.

8. Môi trường lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó lượng tác nhân kháng khuẩn là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,5% trọng lượng, dựa trên tổng trọng lượng của môi trường.

9. Môi trường lên men theo điểm 8, trong đó lượng tác nhân kháng khuẩn là nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,5% trọng lượng, dựa trên tổng trọng lượng của môi trường.

10. Môi trường lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 để tạo ra: etanol; 1,3-propandiol; glyxerol; butanol; 1,4-butandiol; arabitol; xylitol; sorbitol; manitol; axit axetic; axit propionic; axit 3-hydroxy propionic; axit lactic; axit succinic; axit 2,5-furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; axit adipic; axit xitric; axit

aconitic; axit glutamic; axit itaconic; axit levulinic; axit glutaric; axit aspartic; axit malonic; và, hỗn hợp của chúng.

11. Môi trường lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 để tạo ra: 1,4-butandiol; axit propionic; axit 3-hydroxypropionic; axit lactic; axit succinic; axit 2,5-furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; hoặc, axit itaconic.

12. Chúng cấy cho môi trường lên men chứa:

môi trường nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men; trong đó nấm men này được chọn từ giống *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* và *Pichia*; và,

tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) ít nhất một lactylat có công thức 1,



ii) ít nhất một glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của i) và ii),

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

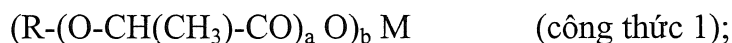
M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đôi được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

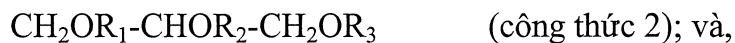
b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

13. Phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm tình trạng nhiễm vi khuẩn gây ra bởi vi khuẩn gram dương trong môi trường nuôi cấy lên men vi khuẩn gram âm trong thiết bị lên men bao gồm việc thêm vào môi trường nuôi cấy lượng hữu hiệu tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) ít nhất một lactylat có công thức 1,



ii) ít nhất một glyxerol este có công thức 2,



hỗn hợp của i) và ii),

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đối được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

14. Phương pháp để thu được sản phẩm lên men, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra môi trường lên men chứa cơ chất cho sự phát triển của vi sinh vật; và,

đưa vào môi trường này chủng cấy chứa môi trường nuôi cấy của vi khuẩn gram âm, nấm mốc hoặc nấm men để thu được sản phẩm lên men, và

thanh lọc, tinh chế và/hoặc cô đặc sản phẩm lên men này,

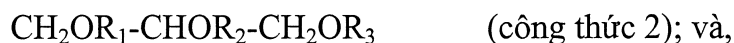
phương pháp này khác biệt ở chỗ, môi trường lên men này bao gồm:

làm chất ngoại sinh, thành phần bổ sung, tác nhân kháng khuẩn được chọn từ:

i) ít nhất một lactylat có công thức 1,



ii) ít nhất một glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của i) và ii),

trong đó:



R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

mỗi  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đối được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm vi khuẩn gram âm được chọn từ nhóm bao gồm: *Escherichia coli*; *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Franciscella*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Legionella*; *Moraxella*; *Neisseria*; *Pantoea*; *Pasteurellaceae*; *Pseudomonas*; *Proteus*; *Salmonella*; *Selenomonadales*; *Serratia*; *Shigella*; *Treponema*; *Vibrio*; *Yersinia*; *Zynomonas*; và, hỗn hợp của chúng.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm được chọn từ nhóm bao gồm: *Escherichia coli*; loài *Pseudomonas*; và, loài *Pasteurellaceae*.

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm được chọn từ nhóm bao gồm: giống *Actinobacillus*, giống *Hemophilus* và giống *Pasteurella*.

18. Phương pháp theo điểm 14, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm một hoặc nhiều nấm mốc được chọn từ giống *Aspergillus* và *Rhizopus*.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm một hoặc nhiều nấm mốc được chọn từ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*; *Rhizopus oligosporus* và *Rhizopus oryzae*.

20. Phương pháp theo điểm 14, trong đó chủng cây nêu trên bao gồm một hoặc nhiều nấm men được chọn từ giống: *Brettanomyces*; *Candida*; *Dekkera*; *Pichia*; và *Saccharomyces*.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 20 để thu được sản phẩm lên men được chọn từ nhóm bao gồm: etanol; 1,3-propandiol; glyxerol; butanol; 1,4-butandiol; arabitol; xylitol; sorbitol; manitol; axetoin; axit axetic; axit propionic; axit 3-hydroxy propionic; axit lactic; axit succinic; axit furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; axit adipic; axit xitric; axit aconitic; axit glutamic; axit itaconic; axit levulinic; axit glutaric; axit aspartic; axit malonic; glyxin; serin; threonin; lysin; isopren; polyhydroxybutyrat và, hỗn hợp của chúng.

22. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 20 để thu được sản phẩm lên men được chọn từ nhóm bao gồm: etanol; 1,3-propandiol; glyxerol; butanol; 1,4-butandiol; arabitol; xylitol; sorbitol; manitol; axit axetic; axit propionic; axit 3-hydroxy propionic; axit lactic; axit succinic; axit 2,5- furandicarboxylic; axit fumaric; axit malic; axit adipic; axit xitric; axit aconitic; axit glutamic; axit itaconic; axit levulinic; axit glutaric; axit aspartic; axit malonic; và, hỗn hợp của chúng.

23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 20 để thu được sản phẩm lên men được chọn từ: axit propionic; axit lactic; axit succinic; 1,4-butandiol; và, axit 2,5-furandicarboxylic.

24. Tác nhân chống vi khuẩn để ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gây nhiễm gram dương trong nuôi cấy vi khuẩn gram âm hoặc nấm mốc hoặc nấm men; trong đó tác nhân chống vi khuẩn này được chọn từ:

i) ít nhất một lactylat có công thức 1,



ii) ít nhất một glyxerol este có công thức 2,



iii) hỗn hợp của i) và ii),

trong đó:

R là nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh;

$R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  mỗi độc lập là H hoặc nhóm C4-C18 axyl, nhóm axyl có mạch alkyl hoặc alkenyl là phân nhánh hoặc không phân nhánh, với điều kiện là ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$  hoặc  $R_3$  là H và ít nhất một trong số  $R_1$ ,  $R_2$ , hoặc  $R_3$  là nhóm axyl;

M là proton ( $H^+$ ) hoặc cation đôi được chọn từ nhóm Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, amoni hoặc amoni được thế có một hoặc nhiều (C1-4)alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều hydroxy;

a là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và,

b là 1 hoặc 2 bằng hóa trị của M.