



(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)



1-0026241

(51)⁷ C11D 3/48; C11D 1/04; C11D 3/20

(13) B

(21) 1-2016-02202

(22) 16/12/2014

(86) PCT/EP2014/077928 16/12/2014

(87) WO2015/091457 A1 25/06/2015

(30) 13198649.9 19/12/2013 EP

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/11/2016 344A

(73) UNILEVER N.V. (NL)

Weena 455, 3013 AL Rotterdam, the Netherlands

(72) DIAZ DE RIENZO Mayri Alejandra (IT); JAMIESON Andrew Stephen (GB);
STEVENSON Paul Simon (GB).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) CHẾ PHẨM DIỆT KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt khuẩn chứa rhamnolipit và chất gây rối loạn tạo màng tế bào.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến chế phẩm diệt khuẩn được cải thiện chứa rhamnolipit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

US 2010/0272690 mô tả việc dùng của *Muscodora crispans* và/hoặc các sản phẩm dễ bay hơi, và chế phẩm phòng sinh chứa thực phẩm thông thường và hợp chất thơm mà thể hiện đặc tính kháng vi sinh vật. Bản mô tả bộc lộ các ví dụ cụ thể mà kết hợp với axit propionic, axit isobutyric và/hoặc axit axetic. Bản mô tả cũng bộc lộ khả năng liên kết của rhamnolipit trong chế phẩm của nó.

WO 2012/0104 mô tả chế phẩm chất tẩy rửa chứa rhamnolipit và lipaza.

EP 2410039 mô tả chế phẩm làm sạch chứa tỷ lệ cụ thể của mono-rhamnolipit và di-rhamnolipit mà có thể bao gồm tùy ý chất phụ gia như axit xitric.

US 2007/191292 mô tả chế phẩm chống nấm chứa ít nhất một syringomycin, ít nhất một pseudo-myxin và các hỗn hợp của chúng; và thành phần chất mang chứa rhamnolipit.

WO 2007/095258 mô tả chế phẩm chứa thành phần bioxit được chọn từ ít nhất một nixin, ít nhất một natamycin và các hỗn hợp của chúng; và thành phần chất mang chứa rhamnolipit.

CN 103146496 bộc lộ chế phẩm tẩy rửa chứa 5 đến 15 phần trọng lượng phần chiết rhamnolipit, từ 1 đến 10 phần trọng lượng este của axit béo sucroza, từ 0,01 đến 0,05 phần trọng lượng 1000U/g sinh học lipaza, và 0,5 đến 1,5 trọng lượng axit dinatri etylendiamintetraaxetic.

WO 2008/013899 bộc lộ chế phẩm làm sạch chứa 0,01 đến 99,9% rhamnolipit, với sự cân bằng chất mang. Axit xitric và axit stearic được bao gồm trong khoảng thành phần chất mang có thể.

WO 02/50225 bộc lộ chế phẩm làm sạch kháng vi sinh vật lỏng chứa (i) ít nhất một chất hoạt động bề mặt, (ii) ít nhất một axit, và (iii) hỗn hợp các dung môi chứa (a) dẫn xuất N-alkylpyrrolidon và (b) đồng dung môi có công thức chung $R_1-O-(EO)_m-(PO)_n-R_2$, trong đó R_1 và R_2 độc lập là C_{2-6} alkyl và hydro, nhưng không phải cả hai là hydro, m và n độc lập là từ 0 đến 5, EO là nhóm etylenoxy và PO là nhóm propylenoxy.

Mặc dù lĩnh vực kỹ thuật trước đó vẫn cần chế phẩm rhamnolipit diệt khuẩn được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật được đề cập

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm diệt khuẩn được cải thiện chứa rhamnolipit.

Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt khuẩn chứa rhamnolipit và chất gây rối loạn màng tế bào, trong đó chất gây rối loạn màng tế bào chứa axit caprylic.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Hiệu quả của rhamnolipit cùng với axit caprylic trên màng sinh học được tạo thành trước bởi *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 và hỗn hợp nuôi cấy được xác định theo điều kiện lưu chuyển Bioflux.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo đó, theo khía cạnh đầu tiên của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt khuẩn chứa rhamnolipit và chất gây rối loạn màng tế bào, trong đó chất gây rối loạn màng tế bào chứa axit caprylic.

Mono-rhamnolipit có một vòng đường rhamnoza đơn. Tên IUPAC là axit 3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-metyloxan-2-yl]oxydecanoyloxy]decanoic.

Trong trường hợp của rhamnolipit, trong toàn bộ bản mô tả sáng chế này, các tiền tố mono- và di- được sử dụng để chỉ lần lượt là mono-rhamnolipit (có vòng đường rhamnoza đơn) và di-rhamnolipit (có hai vòng đường rhamnoza). Nếu chữ viết tắt được sử dụng R1 là mono-rhamnolipit và R2 là di-rhamnolipit.

Mono-rhamnolipit có thể là L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (RhaC₁₀C₁₀ có công thức C₂₆H₄₈O₉) được tạo ra bởi *P. aeruginosa*.

Di-rhamnolipit thường là L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (Rha2C₁₀C₁₀ có công thức C₃₂H₅₈O₁₃).

Trong thực tế nhiều thành phần nhỏ khác với sự kết hợp chiều dài chuỗi alkyl khác nhau, phụ thuộc vào nguồn cacbon và chủng vi khuẩn, tồn tại trong sự kết hợp với các rhamnolipit trên phổ biến hơn. Tỷ lệ mono-rhamnolipit với di-rhamnolipit có thể được kiểm soát bằng phương pháp sản xuất. Một số vi khuẩn chỉ sản xuất mono-rhamnolipit, xem US5767090: Ví dụ 1, một số enzym có thể chuyển đổi mono-rhamnolipit thành di-rhamnolipit.

Rhamnolipit dưới đây là nguồn mono-rhamnolipit và di-rhamnolipit có trong sáng chế (C12:1, C14:1 biểu thị chuỗi axyl béo với liên kết đôi):

- Rhamnolipit được tạo ra bởi *P. aeruginosa* (mono-rhamnolipit): Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-C_{12:1}-C₁₀;

- Rhamnolipit được tạo ra bởi *P. chlororaphis* (chỉ mono-rhamnolipit): Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-C_{12:1}-C₁₀, Rha-C₁₂-C₁₂, Rha-C_{12:1}-C₁₂, Rha-C₁₄-C₁₀, Rha-C_{14:1}-C₁₀;

- Mono-rhamnolipit cũng có thể được tạo ra bởi *P. putida* bằng cách đưa vào gen rhlA và rhlB từ *Pseudomonas aeruginosa* [Cha et al. trong Bioresour Technol, 2008 99 (7):2192-9];

- Rhamnolipit được tạo ra bởi *P. aeruginosa* (di-rhamnolipit): Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₂, Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1};
- Rhamnolipit được tạo ra bởi *Burkholdera pseudomallei* (chỉ di-rhamnolipit): Rha-Rha-C₁₄-C₁₄;
- Rhamnolipit được tạo ra bởi *Burkholdera (Pseudomonas) plantari* (chỉ di-rhamnolipit): Rha-Rha-C₁₄-C₁₄;
- Rhamnolipit được tạo ra bởi *P. aeruginosa* là bước đầu xác định là một trong hai mono- hoặc di-rhamnolipit: C₈-C₈, C₈-C₁₀, C₁₀-C₈, C₈-C_{12:1}, C_{12:1}-C₈, C₁₀-C₁₀, C₁₂-C₁₀, C_{12:1}-C₁₀, C₁₂-C₁₂, C_{12:1}-C₁₂, C₁₄-C₁₀, C_{14:1}-C₁₀, C₁₄-C₁₄.

Tốt hơn là, rhamnolipit chứa ít nhất 20% trọng lượng di-rhamnolipit, tốt hơn là 50% trọng lượng di-rhamnolipit, tốt hơn nữa là 60% trọng lượng, thậm chí tốt hơn nữa là 75% trọng lượng và tốt nhất là ít nhất 90% trọng lượng di-rhamnolipit.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng như nguyên liệu diệt khuẩn thô mà người dùng pha loãng thêm trong chế phẩm hoặc chế phẩm có thể là sản phẩm tiêu dùng sử dụng với mục đích để cung cấp hiệu quả diệt khuẩn với một chất nền hoặc thậm chí là chất bảo quản trong chế phẩm tiêu dùng.

Tốt hơn là, chất gây rối loạn màng tế bào có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% trọng lượng của chế phẩm. Tốt hơn nữa là, màng tế bào có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 10% trọng lượng.

Tốt hơn là, chế phẩm là sản phẩm chăm sóc cá nhân và sản phẩm chăm sóc gia đình.

Sản phẩm chăm sóc gia đình được ưu tiên bao gồm chế phẩm giặt/chế phẩm làm sạch, chế phẩm dưỡng vải, và chất tẩy rửa bề mặt cứng như chế phẩm rửa bát đĩa bằng tay và máy, chất tẩy rửa phòng tắm và bếp. Các bề mặt cứng bao gồm bề mặt nhà bếp và phòng tắm, dao kéo, đồ sành sứ, v.v.

Chế phẩm chăm sóc cá nhân bao gồm dầu gội, dưỡng tóc, chế phẩm khử mùi, chế phẩm làm sạch da và các sản phẩm chăm sóc răng miệng như kem đánh răng và nước súc miệng.

Sau đây là các phương án không giới hạn của sáng chế, được thể hiện qua các ví dụ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các dữ liệu sau đây minh họa hiệu quả chất kìm hãm vi khuẩn của chế phẩm chứa rhamnolipit và chất gây rối loạn màng tế bào là axit caprylic.

Nguyên liệu và phương pháp

Vi sinh vật và các điều kiện nuôi cấy

P. aeruginosa ATCC 15442 và *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, được duy trì trong nước dinh dưỡng cộng với 20% glyxerol ở nhiệt độ -20°C. Vi khuẩn sinh trưởng từ thạch nghiêng dinh dưỡng được ủ trong 24h ở nhiệt độ 30°C đã được dùng để thu được huyền phù vi khuẩn với mật độ quang học 570nm được điều chỉnh để cung cấp 10⁸ cfu/ml.

Đặc tính rhamnolipit

Rhamnolipit chứa 10% (trọng lượng/thể tích) mono-rhamnolipit (C₂₆H₄₈O₉, MW: 504, Nồng độ mixen tới hạn (CMC) : 20 mg/L ở độ pH trung tính) và 10% (trọng lượng/thể tích) dirhamnolipit (C₃₂H₅₈O₁₃, MW: 650, CMC: 1,5 × 10⁻⁴ 30 mg/L ở độ pH trung tính) thu được, được tách ra từ một mẫu thu được từ Jeneil biosurfactant Co. (Saukville, Wisconsin).

Chất gây rối loạn màng tế bào: Axit caprylic

Axit caprylic (CAS RN 0124-07-2) thu được từ Sigma Aldrich (Danh mục số C2875) là lớn hơn 99% độ tinh khiết.

Mono và di-rhamnolipit đã được tách ra từ các mẫu thu được từ Jeneil bằng cách sử dụng quy trình dưới đây và thu được các phân phân đoạn R1/R2 riêng được sử dụng để tạo ra dung dịch rhamnolipit 10% nêu trên.

Lượng được định lượng của JBR425 đã được axit hóa đến độ pH bằng 3 bằng cách sử dụng 12M HCl và được đặt trong tủ lạnh qua đêm. Sau đó, dịch nổi lên trên được chiết xuất ba lần bằng cách sử dụng hỗn hợp 2:1 của cloform và etanol. Sau đó, dung môi đã được loại bỏ bằng cách bốc hơi quay và hỗn hợp rhamnolipit được phân lập sau đó đã được tái hòa tan trong metanol.

Quá trình tách và đặc trưng cho hỗn hợp được thực hiện bằng cách sử dụng HPLC được nối với phổ khối ion hóa bằng electron ion tuyến tính. Các chế độ của ion hóa ở chế độ tiêu cực với phạm vi quét nằm trong khoảng từ 50 đến 1200Da. Cột được sử dụng để tách là cột Phenomenex luna C18 250 x 4,6mm 5 micron. Pha di động: nước (pha di động A) và axetonitril (pha di động B) đã được sử dụng để tách biệt thông qua gradient 60:40 (A:B) thay đổi thành 30:70 (A:B) trong 30 phút. Sau đó, hệ thống đã được duy trì trong 5 phút trước khi trở về điều kiện khởi đầu tất cả ở tốc độ dòng chảy của 0,5ml /phút. Thể tích tiêm là 10 µl.

Bảng 1 - Phân tích JBR425 qua HPLC/MS

Rhamnolipit tương tự	m/z	%
Di-C10-C8	621	1,6
Di-C8-C10	621	1,3
Di-C10-C10	649	67,4
Di-C10-C12:1	675	0,78
Di-C12:1-C10	675	0,016
Di-C10-C12	677	3,18
Di-C12-C10	677	1,12
Mono-C10-C8	475	0,63

Mono-C8-C10	475	0,47
Mono C10-C10	503	21,6
Mono-C10-C12:1	529	0,69
Mono-C12:1-C10	529	0,014
Mono C10-C12	531	1,12
Mono-C12-C10	531	0,023

Sự sinh trưởng màng sinh học trên thiết bị lưu chuyển BioFlux.

Để phân tích hình thành màng sinh học trong điều kiện dòng chảy, hệ thống BioFlux 200 (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA) đã được sử dụng cho phép thu nhận hình ảnh tự động trong tám nhiều giếng đặc hiệu. Để các màng sinh học sinh trưởng, các kênh vi lỏng (độ sâu, 75µm; chiều rộng, 350µm) được sơn lót với TSB (50%) ở 10,0 dyn/cm². Các kênh được cấy với 107 CFU từ môi trường nuôi cấy qua đêm của *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 và hỗn hợp nuôi cấy của cả hai. Sau đó, tấm được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ cho phép các tế bào bám dính. Sau khi màng sinh học đã được tạo ra, các tế bào phù du đã được loại bỏ, và PBS 1X (chất kiểm soát) và phương pháp xử lý khác nhau đã được thêm vào các giếng đầu vào với tốc độ dòng chảy là 279µL/h trong 30 phút. Kết quả được ghi lại với kính hiển vi Evon (10X) (17% ánh sáng).

Kết quả

Sự làm rối loạn màng sinh học của *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 và hỗn hợp nuôi cấy bằng cách sử dụng rhamnolipit và axit caprylic.

Hiệu quả của rhamnolipit cùng với axit caprylic trên màng sinh học được tạo thành trước bởi *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 và hỗn hợp nuôi cấy được xác định theo điều kiện lưu chuyển Bioflux. Việc làm

rối loạn được tạo ra bởi hỗn hợp axit caprylic cùng với rhamnolipit đã được xác nhận. Tất cả các màng sinh học phát triển phân lập trong 48h. Tuy nhiên, đã có thay đổi đáng kể trong tất cả các trường hợp về sự lây lan xung quanh các kênh vi lỏng. Màng sinh học *P. aeruginosa* và môi trường nuôi cấy được trộn được tạo thành (Hình 1A, 1E và 1G) trong điều kiện dòng chảy, tuy nhiên các màng sinh học được tạo thành bởi *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (Hình 1C) không dày, nhưng đủ tốt để được coi là đa bào liên kết là trạng thái sinh lý cơ bản khác so với vi khuẩn phù du sống tự do.

Sau 48 giờ tất cả các tấm được rửa bằng PBS 1X, và các phương pháp xử lý với hỗn hợp của rhamnolipit (0,04% thể tích/thể tích) và axit caprylic (0,01% thể tích/thể tích) đã được sử dụng trong 30 phút, sau khoảng thời gian hơn 90% của màng sinh học bị đứt đoạn. Điều thú vị để lưu ý rằng cách thức mà các vi sinh vật Gram dương và Gram âm đáp ứng với hỗn hợp rhamnolipit và axit caprylic đa dạng, cho thấy hỗn hợp có thể có giữa chúng so với những kết quả khi các thành phần được sử dụng riêng (dữ liệu không được thể hiện). Các kết quả được minh họa trong Hình 1 cho thấy sự tạo thành màng sinh học và sự phá vỡ trong kênh BioFlux. Các hình ảnh là các hình ảnh pha tương phản và thể hiện đầy đủ các màng sinh học được tạo thành sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C, và các hình ảnh được ghi lại bằng kính hiển vi Evon (10X) (17% ánh sáng) sau đây:

(A) Màng sinh học *P. aeruginosa* ATCC 15442 trước khi xử lý.

(B) *P. aeruginosa* ATCC 15442 (A) sau khi xử lý với Rhamnolipit (0,04%) và axit caprylic (0,01%).

(C) *S. aureus* ATCC 9144 trước khi xử lý.

(D) *S. aureus* ATCC 9144 (C) sau khi xử lý với Rhamnolipit (0,04%) và axit caprylic (0,01%).

(E) Nuôi cấy được trộn (*P. aeruginosa* ATCC 15442/*S. aureus* ATCC 9144) trước khi xử lý.

(F) Nuôi cấy được trộn (E) sau khi xử lý với Rhamnolipit (0,04%) và axit caprylic (0,01%).

(G) *P. aeruginosa* ATCC 15442 trước khi xử lý.

(H) *P. aeruginosa* ATCC 15442 (G) sau khi xử lý bằng PBS 1X.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm diệt khuẩn chứa rhamnolipit và chất gây rối loạn màng tế bào, trong đó chất gây rối loạn màng tế bào là axit caprylic.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt chứa chất hoạt động bề mặt tổng hợp.
3. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó rhamnolipit có mặt với lượng từ 1 đến 95% trọng lượng, tính trên tổng trọng lượng chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là từ 10 đến 70% trọng lượng.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này là chế phẩm chăm sóc gia đình hoặc chế phẩm chăm sóc cá nhân.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này là chế phẩm chăm sóc cá nhân, tốt hơn là được chọn từ chế phẩm dầu gội, chế phẩm dưỡng tóc, chế phẩm khử mùi, chế phẩm làm sạch da, chế phẩm chống mồ hôi.
6. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này là chế phẩm chăm sóc gia đình, tốt hơn là được chọn từ chế phẩm giặt và chế phẩm tẩy rửa bề mặt cứng.

Hình 1