



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

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

(11)



1-0031043

(51)⁷ A23K 1/17; A23K 1/16; A01N 61/00; (13) B
A01P 1/00

(21) 1-2013-00601

(22) 13/08/2011

(86) PCT/US2011/047693 13/08/2011

(87) WO2012/027140 01/03/2012

(30) 61/377,819 27/08/2010 US

(45) 25/02/2022 407

(43) 27/05/2013 302A

(73) ANITOX CORPORATION (US)

1055 Progress Circle Lawrenceville, GA 30043, United States of America

(72) Julio PIMENTEL (US).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CHẾ PHẨM KHÁNG KHUẨN VÀ PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ THỨC ĂN GIA SÚC

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa 1% đến 90% trọng lượng là một hoặc hỗn hợp gồm các axit hữu cơ được chọn từ nhóm gồm axit axetic, axit propionic, axit lactic, axit pelargonic, hoặc hỗn hợp của chúng; 10% đến 55% trọng lượng là trans-2-hexenal; 0% đến 30% trọng lượng là terpen; 0% đến 10% trọng lượng là chất hoạt động bề mặt; và nước. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp xử lý thức ăn gia súc bằng cách dùng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn có tác dụng hiệp đồng chứa hỗn hợp gồm các axit hữu cơ, aldehyt béo chưa bão hòa α,β và terpen kháng khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một nghiên cứu gần đây của Pew Charitable Trusts, thuộc trường Đại học Georgetown cho thấy ngộ độc thực phẩm tiêu tốn của Mỹ \$152 tỷ đô la hằng năm cho các chi phí cho sức khỏe. Ước tính hằng năm có 76 triệu người ở Mỹ bị ngộ độc thực phẩm và 5.000 người trong số đó bị chết, theo báo cáo của Trung tâm Phòng ngừa và Kiểm soát Bệnh tật Mỹ (U.S. Centers of Diseases Control and Prevention) (Thomson Reuters 2010, 3/10/2010).

Mong muốn tìm ra thêm chất kháng khuẩn tự nhiên và/hoặc hữu cơ, dẫn đến phải tiến hành một lượng lớn nghiên cứu và chi phí nguyên liệu thô tăng lên do khả năng thương mại thấp của các sản phẩm tự nhiên/hữu cơ mới này.

Một vài chất kháng khuẩn mới đã được phát hiện trong thực vật. Các tác giả đã phát hiện ra rằng khi cỏ hoặc các cây trồng khác bị làm hỏng bằng cách cắt, tia hoặc tiếp xúc với mầm bệnh, chu trình lipoxylaza được kích hoạt và điều này dẫn đến việc tạo ra các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn. Lipoxylaza là enzym được phân bố một cách rộng rãi trong tự nhiên có khả năng xúc tác quá trình oxy hoá axit béo chưa bão hoà, tạo ra hydroperoxit của axit béo, là chất được dùng làm chất nền để tổng hợp các hợp chất có vai trò quan trọng hệ thống bảo vệ cây (Kishimoto, K.; Matsui, K.; Ozawa, R.; Takabayashi, J. "Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*." *Phytochemistry* 2008, v. 69, 2127-2132; Gardini, F.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M.E. "Effect of *trans*-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity." *Letters in App. Microbiology* 2001, v. 33, 50-55).

Aldehyt được thể hiện bằng công thức chung HCHO , trong đó R có thể là hydro hoặc nhóm béo, thơm hoặc dị vòng. Aldehyt béo chưa bão hoà α, β có tầm quan trọng đáng kể về mặt thương mại có từ ba đến mười đơn vị cacbon. Chúng hoà tan một cách vừa phải trong nước và độ tan của chúng giảm khi khối lượng phân tử tăng.

Aldehyt béo chưa bão hoà α, β bao gồm propenal, trans-2-butenal, 2-metyl-2-butenal, 2-metyl-(E)-2-butenal, 2-pentenal, trans-2-hexenal, trans-2-hexen-1-ol, 2-metyl-2-pentenal, 2-isopropylpropenal, 2-etyl-2-butenal, 2-etyl-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, 3,7-đimetyl-6-octenal, 3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2E)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2Z)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, trans-2-nonenal, (2E,6Z)-nonadienal, 10-undecanal, 2-dodexenal và các hợp chất khác. Sáng chế bao gồm aldehyt béo chưa bão hoà α, β có 3 đến 12 nguyên tử cacbon.

Việc phá vỡ các chất béo và phospholipit dẫn đến việc tạo ra ba aldehyt có sáu nguyên tử cacbon và chín nguyên tử cacbon, trong số đó là (2E, 6Z)-nonadienal, trans-2-nonaenal và trans-2-hexenal. Các hợp chất này được tạo ra nhờ enzym bằng tác dụng kết hợp của hai enzym khác nhau của chu trình lipoxylaza (LOX) thực vật. Trong phản ứng thứ nhất, LOX xúc tác phản ứng oxy hóa các polyaxit béo chưa bão hoà, như axit linoleic và axit linolenic, với việc tạo ra 9-hydroperoxit hoặc 13-hydroperoxit. Các hợp chất này là rất không ổn định và bị phân cắt thành aldehyt và oxo axit bằng enzym hydroperoxit lyaza (HPL). Bắt đầu từ 9-hydroperoxy, thu được trans-2-nonaenal và (2E, 6Z)-nonadienal, trong khi hexenal và trans-2-hexenal thu được từ các chất dẫn xuất 13-hydroperoxy. Trong phản ứng thứ hai, các aldehyt này có thể được chuyển hoá thành rượu tương ứng nhờ tác dụng của enzym alcohol dehydrogenaza (Hubert, J.; Munzbergova, Z.; Santino, A. "Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles." *Pest Manag. Sci.* 2008, v. 64, 57-64).

Hợp chất dễ bay hơi được sử dụng trong sáng chế này là trans-2-hexenal, là aldehyt chứa liên kết đôi, có sáu cacbon, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$ và khối lượng phân tử = 98,14. Trans-2-hexenal tự nhiên hoặc tổng hợp, còn được gọi là aldehyt lá, được xem là hương liệu tự nhiên theo Hướng dẫn của Liên minh châu Âu (EU Council Directive) 88/388/EEC và Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ (US FDA) 21CFR101.22.

Trans-2-hexenal có mặt trong rất nhiều cây trồng ăn được như táo, lê, nho, dâu tây, kiwi, cà chua, ô liu, v.v.. Việc sử dụng thực vật và chất chiết thực vật đã thành công trong các nghiên cứu nhằm tìm ra chất kháng khuẩn mới. Chẳng hạn như, quả điều có tác dụng chống *Helicobacter pylori* và *S. cholerasis* (50ug/ml đến 100ug/ml). Hai thành phần chủ yếu xác định được là axit anacardic và trans-2-hexenal. Nồng độ ức chế tối thiểu và hoạt tính diệt sinh vật tối thiểu của trans-2-hexenal được xác định lần lượt là 400ug/ml và 800ug/ml (Kubo, J.; Lee, J. R.; Kubo, I. “Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple.” *J. Agric. Food Chem.* 1999, v. 47, 533-537; Kubo, I. And K. Fujita, “Naturally Occurring Anti-*Salmonella* Agents”. *J. Agric. Food Chem.* 2001, v. 49, 5750-5754). Kim và Shin đã phát hiện ra rằng trans-2-hexenal (247mg/l) là có tác dụng chống *B. cereus*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* và *E. coli* O157:H7 (Kim, Y. S.; Shin, D. H. “Volatile Constituents from the Leaves of *Callicarpa japonica* Thunb. and Their Antibacterial Activities.” *J. Agric. Food Chem.* 2004, v. 52, 781-787). Nakamura và Hatanaka (“Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both gram-negative and gram-positive bacteria.” *J. Agric. Food Chem.* 2002, v. 50 no,26, 7639-7644), đã chứng minh được rằng (3E)-hexenal có tác dụng trong việc kiểm soát *Staphylococcus aureus*, *E. coli* và *Salmonella typhimurium* với nồng độ nằm trong khoảng từ 3ug/ml đến 30ug/ml. Trans-2-hexenal ức chế một cách triệt để sự tăng sinh của cả biến thể bệnh lý của *P. syringae* (570µg/l không khí) và *E. coli* (930 microgam/l không khí) (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.; Collins, G.; Hilderbrand, D. “Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation.” *J. Agric. Food Chem.* 1993, v. 41, 506-510). Cũng quan sát thấy rằng trans-2-hexenal với hàm lượng 250ug/ml là hữu hiệu để ức chế sự phát triển của *Phoma mycelium* (Saniewska, S. and M. Saniewski, 2007. “The effect of trans-2-hexenal and trans-2-nonaenal on the mycelium growth of *Phoma narcissi* *in vitro*, *Rocz. AR. Pozn. CCCLXXXIII, Ogrodn.* V. 41,189-193”). Trong một nghiên cứu kiểm soát nấm mốc trên trái cây, đã phát hiện ra rằng trans-2-hexenal không có độc tính thực vật với quả mơ, nhưng có độc tính thực vật với quả đào và quả xuân đào với nồng độ 40µl/l (Neri, F., M. Mari, S. Brigati and P. Bertolini, 2007, “Fungicidal activity of plant volatile

compounds for controlling *Monolinia laxa* in stone fruit,” *Plant Disease* v. 91, no.1, 30-35). Trans-2-hexenal (12,5µl/l) có tác dụng kiểm soát *Penicillium expansum* gây bệnh mốc xanh (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. “Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours.” *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, v. 41, 101-108. Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. “Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in ‘Conference’ pears.” *J. Appl. Microbiol.* 2006, v. 100, 1186-1193). Hamilton-Kemp và các đồng tác giả (*J. Agric. Food Chem.* 1991, v. 39, no.5, 952-956) đề xuất rằng hơi trans-2-hexenal ức chế được sự nảy mầm của bào tử *Botrytis* và hạt phấn táo.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/0087094 đề xuất việc sử dụng ít nhất hai hợp chất được coi là an toàn (GRAS) có hoạt tính diệt vi khuẩn kết hợp với rượu (isopropanol hoặc isopropanol/etanol) với lượng nhỏ hơn 50% làm chất diệt vi khuẩn. Trans-2-hexenal có thể là một trong số các hợp chất GRAS. Ngoài ra, Archbold và các đồng tác giả quan sát thấy việc sử dụng trans-2-hexenal với lượng 0,86mmol hoặc 1,71mmol (lần lượt là 100 microlit hoặc 200 microlit hợp chất nguyên chất cho mỗi đồ chứa dung tích 1,1 lit) trong 2 tuần để xông khói sau thu hoạch nho không hạt cho thấy triển vọng kiểm soát nấm mốc (Archbold, D.; Hamilton-Kemp, T.; Clements, A.; Collins, R. “Fumigating ‘Crimson Seedless’ Table Grapes with (E)-2-Hexenal Reduces Mold during Long-term Postharvest Storage.” *HortScience*. 1999, v. 34, no. (4, 705-707).

Patent Mỹ số 5,698,599 đề xuất phương pháp ức chế việc tạo ra độc tố nấm trong thực phẩm bằng cách xử lý bằng trans-2-hexenal. Trans-2-hexenal ức chế một cách hoàn toàn sự phát triển của *A. flavus*, *P. notatum*, *A. alternata*, *F. oxysporum*, các loài *Cladosporium*, *B. subtilis* và *A. tumerfaciens* ở nồng độ bằng 8ng/l không khí. Khi so sánh trans-2-hexenal với xitral về khả năng phòng trừ nấm men (10^5 CFU/chai) trong đồ uống đã phát hiện ra rằng việc sử dụng trans-2-hexenal với nồng độ 25ppm kết hợp với xử lý nhiệt (56°C trong thời gian 20 phút) tương đương với việc sử dụng xitral với nồng độ nằm trong khoảng từ 100ppm đến 120ppm. Với đồ uống không được xử lý nhiệt, cần có trans-2-hexenal với hàm lượng 35ppm để làm ổn định chúng (Belletti, N.; Kamdem, S.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Covelli, A.; Gardini, F. “Antimicrobial Activity of

Aroma Compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and Improvement of Microbiological Stability of Soft Drinks as Assessed by Logistic Regression.” *AEM*. 2007, v. 73, no. 17, 5580-5586). Không chỉ trans-2-hexenal được sử dụng làm chất kháng khuẩn mà còn thấy rằng chúng có tác dụng kiểm soát côn trùng. Các chất dễ bay hơi (nghĩa là trans-2-hexenal) có tác dụng chống bọ cánh cứng như *Tibolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granaries*, *Sitophilus orazyzae* và *Cryptolestes perrugineus* (Hubert, J.; Munzbergova, Z.; Santino, A. “Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles.” *Pest Manag. Sci.* 2008, v. 64, 57-64). Patent Mỹ số 6,201,026 đề xuất aldehyt hữu cơ có ba hoặc nhiều nguyên tử cacbon để kiểm soát rệp vùng.

Một vài patent đề xuất việc sử dụng trans-2-hexenal làm hương liệu hoặc chất tạo hương thơm. Patent Mỹ số 6,596,681 đề xuất việc sử dụng trans-2-hexenal làm hương liệu trong khăn lau bề mặt. US 6,387,866, US 6,960,350 và US 7,638,114 đề xuất việc sử dụng tinh dầu hoặc terpen (chẳng hạn như trans-2-hexenal) làm chất tạo hương thơm cho các sản phẩm kháng khuẩn. US 6,479,044 bộc lộ dung dịch kháng khuẩn chứa chất hoạt động bề mặt anion, chất kháng khuẩn đa cation và nước, trong đó tinh dầu được bổ sung vào làm chất tạo hương thơm. Chất tạo hương thơm này có thể là terpen như trans-2-hexenal hoặc các loại terpen khác. US 6,323,171, US 6,121,224 và US 5,911,915, bộc lộ hợp chất vi nhũ tương nhằm mục đích kháng khuẩn chứa chất hoạt động bề mặt cation, trong đó tinh dầu được bổ sung vào làm chất tạo hương thơm. Chất tạo hương thơm này có thể là một số loại terpen khác nhau bao gồm trans-2-hexenal. US 6,960,350 bộc lộ hương liệu chống nấm, trong đó tác dụng hiệp đồng được phát hiện khi các loại terpen khác nhau được sử dụng kết hợp (chẳng hạn như trans-2-hexenal với benzaldehyt).

Kiểu tác dụng của trans-2-hexenal được cho là nhờ sự thay đổi của màng tế bào do phản ứng của trans-2-hexenal với gốc sulfhydryl hoặc gốc xystein hoặc việc hình thành các bazơ Schiff với nhóm amino của peptit và protein (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.; Collins, G.; Hilderbrand, D. “Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation.” *J. Agric. Food Chem.* 1993, v.41, 506-510). Trans-2-hexenal được thông báo là có vai trò làm chất hoạt động bề mặt,

nhưng có khả năng thẩm qua nhờ sự khuếch tán thụ động qua màng huyết tương. Khi ở bên trong tế bào, gốc aldehyt chưa bão hoà α,β của nó phản ứng với các nhóm ái nhân quan trọng về mặt sinh học. Đã biết rằng, gốc aldehyt chưa bão hoà α,β có thể phản ứng với các nhóm sulphydryl, chủ yếu bằng phản ứng cộng 1,4 trong các điều kiện sinh lý (Patrignani, F.; Lucci, L.; Belletti, N.; Gardini, F.; Guerzoni, M. E.; Lanciotti, R. "Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*." *International J. Food Micro.* 2008, v.123, 1-8).

Trans-2-hexenal là chất ức chế phospholipaza D, là enzym xúc tác cho phản ứng thủy phân màng phospholipit, xảy ra trong quá trình thành thực và chín của rất nhiều loại của trái cây và rau. Vì vậy, có thể đề xuất rằng trans-2-hexenal có thể ức chế quá trình chín (công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0031744 A1). Có thể đề xuất rằng việc ức chế *Salmonella typhimurim* và *Staphylococcus aureus* bằng trans-2 hexenal là do liên kết kỵ nước và liên kết hydro của các phần phân chia của nó trong lớp lipid kép. Sự phá hủy của hệ vận chuyển điện tử và làm nhiễu độ thẩm của màng cũng được đề xuất là một kiểu tác dụng khác (Gardini, F.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M.E. "Effect of trans-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity." *Letters in App. Microbiology.* 2001, v. 33, 50-55). Việc ức chế sự phân rã *P. expansum* có thể là do sự tổn thương màng nấm của bào tử đỉnh nảy mầm. (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. "Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours." *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, v. 41, 101-108; Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. "Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears." *J. Appl. Microbiol.* 2006, v.100, 1186-1193).

Các nghiên cứu đã được tiến hành để so sánh trans-2-hexenal với các hợp chất tương tự khác. Deng và các đồng tác giả cho thấy rằng các chất dễ bay hơi chưa bão hoà trans-2-hexenal và trans -2-hexen-1-ol có tác dụng ức chế mạnh hơn các chất dễ bay hơi bão hoà, hexanal và 1-hexanol (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.;

Collins, G.; Hilderbrand, D. "Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation." *J. Agric. Food Chem.* 1993, v. 41, 506-510). Trans-2-hexenal hoạt động mạnh hơn hexanal, nonanal và trans-2-octenal chống lại tất cả các chủng vi khuẩn ATCC (Bisignano, G.; Lagana, M. G.; Trombetta, D.; Arena, S.; Nostro, A.; Uccella, N.; Mazzanti, G.; Saija, A. "In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L." *FEMS Microbiology Letters*. 2001, v. 198, 9-13). Các nghiên cứu khác đã phát hiện ra rằng (*E*)-2-hexenal có nồng độ ức chế tối thiểu sự phát triển của nấm mốc thấp hơn hexanal, 1-hexanol, (*E*)-2-hexen-1-ol, và (*Z*)-3-hexen-1-ol như xác định được đối với một vài loài nấm mốc, về cơ bản theo trình tự aldehyt > keton > rượu (Andersen, R. A.; Hamilton-Kemp, T.; Hilderbrand, D. F.; McCracken Jr., C. T.; Collins, R. W.; Fleming, P. D. Structure—Antifungal Activity Relationships among Volatile C₆ and C₉ Aliphatic Aldehydes, Ketones, and Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 1994, v. 42, 1563-1568). Trans-2-hexenal và axit hexanoic là hữu hiệu hơn hexanol trong việc ức chế vi khuẩn salmonella (Kubo, I. And K. Fujita, "Naturally Occurring Anti-Salmonella Agents." *J. Agric. Food Chem.* 2001, v. 49, 5750-5754).

Muroi và các đồng tác giả kết luận rằng trans-2-hexenal có hoạt tính kháng khuẩn rộng nhưng hoạt tính sinh học của nó (nằm trong khoảng từ 50µg/ml đến 400µg/ml) thường là không đủ hữu hiệu để sử dụng trong thực tế (Muroi, H.; Kubo, A.; Kubo, I. "Antimicrobial Activity of Cashew Apple Flavor Compounds," *J. Agric. Food Chem.* 1993, v. 41, 1106-1109). Các nghiên cứu đã cho thấy rằng trans-2-hexenal có thể khiến một số loại chất kháng khuẩn nhất định trở nên hữu hiệu. Một vài sáng chế đề xuất việc sử dụng chất tăng cường công hiệu cho chất kháng sinh aminoglycosit (US 5,663,152), và chất tăng cường công hiệu cho chất kháng sinh polymyxin (US 5,776,919 và US 5,587,358). Các chất tăng cường công hiệu này có thể bao gồm indol, anethol, 3-metylinol, axit 2-hydroxy-6-R-benzoic hoặc trans-2-hexenal. Tác dụng hiệp đồng mạnh được quan sát thấy khi trans-2-eptenal, trans-2-nonenal, trans-2-dexenal và (*E,E*)-2,4-decadienal được thử nghiệm cùng nhau (theo tỷ lệ 1:1:1:1) với các chủng vi khuẩn từ ATCC và các chủng phân lập được trên lâm sàng (Bisignano, G.; Lagana, M. G.; Trombetta, D.; Arena, S.; Nostro, A.; Uccella, N.; Mazzanti, G.; Saija, A." *In vitro*

antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L.” *FEMS Microbiology Letters*. 2001, v. 198, 9-13).

Con người tiếp xúc hàng ngày với trans-2-hexenal qua việc tiêu thụ thực phẩm và đồ uống. Mức độ con người tiếp xúc với trans-2-hexenal là ~350µg/kg/ngày, trong đó 98% lượng hợp chất này có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên và 2% từ hương liệu nhân tạo. Trans-2-hexenal không chắc gây độc cho người vì hàm lượng gây độc ở chuột *Rattus* là cao hơn 30 lần tỷ lệ hấp thu ở người (Stout, M. D.; Bodes, E.; Schoonhoven, R.; Upton, P. B.; Travlos, G. S.; Swenberg, J. A. “Toxicity, DNA Binding, and Cell Proliferation in Male F344 Rats following Short-term Gavage Exposures to Trans-2-Hexenal.” *Soc. Toxicologic. Pathology* March 24 2008, 1533-1601 trực tuyến). Trong nghiên cứu khác ở chuột, việc cho ăn trans-2-hexenal với hàm lượng bằng 0ppm, 260ppm, 640ppm, 1600ppm hoặc 4000ppm trong thời gian 13 tuần không gây ra sự thay đổi bất kỳ về các thông số huyết học hoặc trọng lượng của các cơ quan. Với hàm lượng 4000ppm có xuất hiện hiện tượng giảm thể trọng và tỷ lệ hấp thu, nhưng không đáng kể (Gaunt, I. F.; Colley, J. “Acute and Short-term Toxicity Studies on trans-2-Hexenal.” *Fd Cosmet. Toxicol.* 1971, v. 9, 775-786).

Thậm chí ở trái cây, việc tiếp xúc trong thời gian từ hai mươi tư giờ đến bảy ngày của lê và táo với trans-2-hexenal (12,5µl/l) không ảnh hưởng đến hình thức, màu sắc, độ rắn, hàm lượng chất rắn hoà tan hoặc độ axit có thể chuẩn độ được của trái cây. Trong thử nghiệm đánh giá mùi vị có huấn luyện, không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về chất lượng cảm quan của táo “Golden Delicious” không được xử lý và được xử lý bằng trans-2-hexenal, trong khi quan sát thấy hiện tượng lưu lại mùi lạ ở các trái cây “Bartlett”, “Abate Fetel” và “Royal Gala” (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, 41, 101-108; Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in ‘Conference’ pears. *J. Appl. Microbiol.* 2006, v.100, 1186-1193).

Với nồng độ 1,8µg trans-2-hexenal/ml không khí có thể ức chế gần 100% sự nảy mầm của hạt đậu tương. Mức độ ức chế phát triển theo thứ tự là trans-2-hexenal >

hexanal > trans-2-nonenal khi các hạt nảy mầm được tiếp xúc với hơi aldehyt bão hòa (Gardner, H. W.; Dornbos Jr., D. L.; Desjardins, A. E. Hexenal, trans-2-Hexenal, and trans-2-Nonenal Inhibit Soybean, *Glycine max*, Seed Germination. *J. Agric. Food Chem.* 1990, v. 38, 1316-1320).

Tình trạng kỹ thuật không đề xuất hoặc quan sát thấy việc sử dụng trans-2-hexenal kết hợp với các axit hữu cơ cải thiện hoạt tính kháng khuẩn theo kiểu hiệp đồng của bản thân mỗi trong số các thành phần này. Đã có đề xuất về tác dụng hiệp đồng với hỗn hợp gồm các tinh dầu và chất tăng cường công hiệu của chất kháng sinh.

Các chất ức chế nấm mốc và thuốc diệt khuẩn thương mại bao gồm một axit hữu cơ hoặc hỗn hợp gồm các axit hữu cơ và formaldehyt. Các axit này chủ yếu là axit propionic, axit benzoic, axit butyric, axit axetic, và axit formic. Các axit hữu cơ là chất phụ gia chủ yếu để làm giảm nguy cơ ngộ độc thực phẩm. Cơ chế tiết hoạt tính kháng khuẩn của các axit béo mạch ngắn là các axit không phân ly ($\text{RCOOH} = \text{phi ion hóa}$) có khả năng thâm lipid và theo cách này chúng có thể đi qua thành tế bào vi khuẩn và phân ly trong phần bên trong có tính kiềm hơn của vi sinh vật ($\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$) làm cho tế bào chất không ổn định để sống. (Van Immerseel, F., J.B. Russell, M.D. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2006, "The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy," *Avian Pathology*. v. 35, no.3, 182-188; Paster, N. 1979, "A commercial study of the efficiency of propionic acid and calcium propionate as fungistats in poultry feed," *Poult. Sci.* v. 58, 572-576).

Axit propionic là chất ức chế nấm mốc tiềm năng hơn axit axetic, axit valeric, axit butyric, axit lactic và axit benzoic. Axit propionic có liều lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,25% trái ngược với các axit hữu cơ khác cần có liều lượng hơn 0,5% (Higgins C. and F. Brinkhaus, 1999, "Efficacy of several organic acids against mold," *J. Applied Poultry Res.* v.8, 480-487).

Việc nuôi lợn con mới cai sữa bằng ngô đã được xử lý bằng hỗn hợp gồm 80% axit propionic và 20% axit axetic với hàm lượng 0,5% không có tác dụng bất lợi cho năng suất của lợn (Rahnema, S. và S. M. Neal, 1992, Preservation and use of chemically

treated high-moisture corn by weanling pigs, J. Prod. Agric. v. 5, no. 4, 458-461). Ở gà giò, việc bổ sung axit axetic với hàm lượng 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3% và 0,4% vào nước không ảnh hưởng đến năng suất hoặc số lượng vi khuẩn đường ruột ở gà giò (Akbari, M.R., H. Kermanshani và G.A. Kalidari, 2004, "Effect of acetic acid administration in drinking water on performance growth characteristics and ileal microflora of broiler chickens," *J. Sci. & Technol. Agric. & Natur. Resour.* 8 (3): 148).

Axit pelargonic (axit nonanoic) là axit béo có trong tự nhiên. Nó là chất lỏng không màu, dạng dầu, ở nhiệt độ thấp nó chuyển sang dạng rắn. Nó có mùi lợm giọng như axit butyric và hầu như không tan trong nước. Axit pelargonic đã được sử dụng làm chất diệt cỏ không chọn lọc. Scythe (57% axit pelargonic, 3% axit béo cùng họ và 40% nguyên liệu trợ) là chất diệt cỏ phổ rộng sau nảy mầm hoặc đốt cháy do Mycogen/Dow Chemical cung cấp. Kiểu tác dụng diệt cỏ của axit pelargonic đầu tiên là thực hiện xâm nhập màng trong bóng tối và ánh sáng ban ngày và thứ hai là thực hiện peroxy hoá bằng cách tạo ra các gốc trong ánh sáng ban ngày bằng clophyll nhạy được thay thế từ màng thylakoid (B. Lederer, T. Fujimori., Y. Tsujino, K. Wakabayashi và P. Boger, 2004 "Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 151-156).

Chadeganipour và Haims (2001) cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của axit béo mạch trung bình để ngăn ngừa sự phát triển của *M. gypseum* là 0,02mg/ml axit capric và đối với axit pelargonic là 0,04mg/ml trong môi trường rắn và 0,075mg/ml axit capric và 0,05mg/ml pelargonic trong môi trường lỏng. Các axit này được thử nghiệm một cách độc lập và không ở dạng hỗn hợp (Chadeganipour and Haims, 2001 "Antifungal activities of pelargonic and capric acid on *Microsporum gypseum*" *Mycoses* v. 44, no 3-4, 109-112). N. Hirazawa và các đồng tác giả ("Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against ciliated *Crptocaryon irritans* infestation in red sea bream *Pagrus major*," 2001, *Aquaculture* v. 198, 219-228) phát hiện ra rằng axit nonanoic cũng như axit béo có 6 đến 10 nguyên tử cacbon là hữu hiệu để kiểm soát sự phát triển của vật ký sinh *C. irritans* và axit béo có 8, 9 và 19 nguyên tử cacbon là công hiệu hơn. Đã phát hiện ra rằng *Trichoderma harzianum*, vật liệu phòng trừ sinh học cho cây cacao, tạo ra axit pelargonic

là một trong số nhiều hóa chất, hữu hiệu để kiểm soát sự nảy mầm và phát triển của mầm bệnh hại cacao (Aneja, M., Gianfagna, T. J., and Hebbar, K. P. 2005. “*Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spores germination and mycelial growth of two cacao pathogens”. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 304-307).

Một vài patent Mỹ bộc lộ việc sử dụng axit pelargonic làm thuốc diệt nấm và thuốc diệt khuẩn: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/026685 bộc lộ thuốc diệt nấm để dùng trong nông nghiệp chứa một hoặc nhiều axit béo và một hoặc nhiều axit hữu cơ khác với axit béo này. Trong hỗn hợp gồm các axit hữu cơ và axit béo này, axit hữu cơ có vai trò làm chất hiệp đồng công hiệu cho axit béo khiến cho nó có chức năng làm thuốc diệt nấm. US 5,366,995 bộc lộ phương pháp triệt bệnh nhiễm nấm và vi khuẩn ở thực vật và tăng cường hoạt tính của thuốc diệt nấm và thuốc diệt khuẩn ở thực vật bằng cách sử dụng axit béo và các chất dẫn xuất của chúng. Chế phẩm này gồm có 80% axit pelargonic hoặc các muối của nó để kiểm soát nấm thực vật. Axit béo được sử dụng chủ yếu là các axit có 9 đến 18 nguyên tử cacbon. US 5,342,630 bộc lộ thuốc trừ sâu mới để dùng cho thực vật chứa muối vô cơ có khả năng làm tăng hiệu quả của axit béo có 8 đến 22 nguyên tử cacbon. Một trong số các ví dụ thể hiện sản phẩm dạng bột chứa 2% axit pelargonic, 2% axit capric, 80% bột talc, 10% natri cacbonat và 5% kali cacbonat. US 5,093,124 bộc lộ thuốc diệt nấm và thuốc diệt động vật chân đốt dùng cho thực vật chứa axit alpha mono carboxylic và các muối của chúng. Tốt hơn, nếu thuốc diệt nấm này chứa axit béo có 9 đến 10 nguyên tử cacbon, được trung hòa một phần bằng kim loại kiềm hoạt động như kali. Hỗn hợp đã bộc lộ gồm 40% hoạt chất hoà tan trong nước và bao gồm 10% pelargonic, 10% axit capric và 20% axit béo của dừa, tất cả được trung hòa bằng kali hydroxit. US 6,596,763 bộc lộ phương pháp kiểm soát bệnh nhiễm trùng da bằng cách sử dụng các axit béo có 6 đến 18 nguyên tử cacbon hoặc các chất dẫn xuất của chúng. US 6,103,768 và US 6,136,856 bộc lộ tính hữu dụng độc đáo của axit béo và chất dẫn xuất để triệt bệnh nhiễm nấm và vi khuẩn tồn tại ở thực vật. Phương pháp này không có tác dụng phòng ngừa mà là hữu hiệu đối với các trường hợp đã nhiễm khuẩn. Sharpshooter, sản phẩm hiện có bán trên thị trường chứa 80% axit pelargonic, 2% chất nhũ hóa và 18% chất hoạt động bề mặt là hữu hiệu chống *Penicillium* và *Botrytis* spp. US

6,638,978 bộ lọc chất bảo quản kháng khuẩn bao gồm este glyxerol của axit béo, hỗn hợp hai thành phần gồm các axit béo (có 6 đến 18 nguyên tử cacbon) và một axit béo thứ hai (có 6 đến 18 nguyên tử cacbon), trong đó axit béo thứ hai khác với axit béo thứ nhất, để bảo quản thực phẩm. WO 01/97799 bộ lọc việc sử dụng axit béo mạch trung bình làm tác nhân kháng khuẩn. Thấy rằng việc tăng độ pH từ 6,5 lên 7,5 làm tăng MIC của axit béo mạch ngắn chứa mạch cacbon có 6 đến 8 nguyên tử cacbon.

Axit pelargonic được sử dụng làm thành phần của dung dịch làm sạch bề mặt tiếp xúc của thực phẩm trong các cơ sở chế biến thực phẩm. Sản phẩm của EcoLab chứa 6,49% axit pelargonic làm hoạt chất có thể được sử dụng làm chất làm sạch cho tất cả các bề mặt tiếp xúc của thực phẩm (12 CFR 178.1010 b). Cục Quản Lý Thực Phẩm & Dược Phẩm Mỹ (FDA) đã chấp thuận axit pelargonic làm hương liệu thực phẩm tổng hợp (21 CFR 172.515), làm tá dược, chất trợ giúp sản xuất và chất làm sạch được sử dụng trong quá trình tiếp xúc với thực phẩm (12 CFR 178.1010 b) và trong quá trình rửa hoặc trợ giúp cho quá trình bóc vỏ trái cây và rau (12 CFR 173.315). Axit pelargonic được đưa vào danh mục các chất được phép sử dụng (Authorized Substances), 1990, phần 5.14, Các hợp chất rửa trái cây và rau, của Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA).

Chất nhũ hóa hoặc chất hoạt động bề mặt không ion đã được etoxy hóa như dầu thầu dầu đã được etoxy hóa được tạo ra bằng phản ứng của dầu với etylen oxit. Chất nhũ hóa dầu thầu dầu đã được etoxy hóa có chiều dài mạch khác nhau, tùy thuộc vào số lượng etylen oxit được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Tỷ lệ mol có thể thay đổi từ 1 phân tử dầu thầu dầu và 1 đến 2000 phân tử của etylen oxit tạo ra chất nhũ hóa dầu thầu dầu đã được etoxy hóa được gọi là chất nhũ hóa dầu thầu dầu PEG-x (polyetylen glycol), trong đó “x” là số phân tử etylen oxit. (Fruijtier-Polloth, Claudia, 2005, “Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products” *Toxicology*, v. 214, 1–38). Các chất nhũ hóa này đã được sử dụng một cách rộng rãi để hòa tan các thuốc không hòa tan trong nước dùng để điều trị người và động vật. Chúng là các hợp chất ổn định, khó bay hơi, không bị thủy phân hoặc bị hỏng trong quá trình bảo quản. Dầu thầu dầu thu được từ hạt của *Ricinus communis* và chủ yếu chứa triglyxerit của axit rixinoleic, axit isorixinoleic, axit stearic và axit dihydroxystearic. Dầu thầu dầu chứa

90% axit rixinoleic (axit 12-hydroxyoleic), không độc, phân hủy được bằng vi khuẩn, và là nguồn có thể tái sinh được.

Một vài đơn PCT đã được nộp đề xuất việc sử dụng chất hoạt động bề mặt dầu thầu đã được dầu etoxy hóa. WO 99/60865 đề cập đến nhũ tương gồm chất hoạt động bề mặt-nước được bổ sung vào thức ăn gia súc trước hoặc sau khi xử lý nhiệt. Sáng chế này đề cập đến nhũ tương giúp cho việc duy trì hoặc làm giảm lượng nước hao hụt trong quá trình xử lý nhiệt. Nhũ tương này gồm có nước với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8 phần và chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,5 phần. WO 97/28896 đề cập đến việc sử dụng chất hoạt động bề mặt để tạo điều kiện cho sự phân tán của mật đường. WO 96/11585 đề cập đến việc sử dụng dầu thầu dầu đã được etoxy hóa trong thức ăn gia súc để cải thiện giá trị dinh dưỡng của thức ăn gia súc. WO 95/28091 đề cập đến việc bổ sung dầu thầu dầu đã được etoxy hóa vào thức ăn gia súc để cải thiện độ khả dụng của các chất dinh dưỡng trong thức ăn gia súc khô thông thường nhằm gia tăng mức độ sinh trưởng của động vật và giảm tỷ lệ tử vong. Bốn sáng chế này đề cập việc bổ sung chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa, tốt hơn nữa là nhũ tương, để cải thiện khả năng tiêu hóa của các chất kỵ nước có mặt trong thức ăn gia súc chứ không đề xuất lợi ích đối với việc sản xuất thức ăn gia súc hoặc ngăn ngừa sự phát triển nấm mốc trong thức ăn gia súc.

Terpen, là chất được coi như an toàn (Generally Recognized as Safe (GRAS)), là rất phổ biến trong tự nhiên, chủ yếu trong thực vật vì là thành phần cấu tạo của tinh dầu. Khôi cấu thành của chúng là hydrocacbon isopren (C_5H_8)_n. Ví dụ về terpen bao gồm xitral, pinen, nerol, b-ionon, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, terpeniol, anethol, camphor, menthol, limonen, nerolidol, farnesol, phytol, caroten, squalen, thymol, tocotrienol, rượu perilylic, bomeol, myrxen, simen, caren, terpen, linalool và các chất khác. Geraniol, tocotrienol, rượu perilylic, b-ionon và d-limonen, ức chế hoạt tính HMG-COA reductaza ở gan, là bước hạn chế tốc độ trong quá trình tổng hợp cholesterol, và làm giảm lượng cholesterol một cách vừa phải ở động vật (Elson C. E. và S. G. Yu, 1994, "The Chemoprevention of Cancer by Mevalonate-Derived Constituents of Fruits and Vegetables," *J. Nutr.* v.124, 607-614). D-limonen và geraniol làm giảm khối u ở động vật

có vú (Elgebede, J. A., C. E. Elson, A. Qureshi, M. A. Tanner and M. N. Gould, 1984, "Inhibition of DMBA-Induced Mammary Cancer by Monoterpene D-limonene," *Carcinogenesis* v.5, no.5, 661-664; Elgebede, J. A., C. E. Elson, A. Qureshi, M. A. Tanner and M. N. Gould, 1986, "Regression of Rat Primary Mammary Tumors Following Dietary D-limonene," *J. Nat'l Cancer Institute* v.76, no. 2, 323-325; Karlson, J., A. K. Borg, R. Unelius, M. C. Shoshan, N. Wilking, U. Ringborg and S. Linder, 1996, "Inhibition of Tumor Cell Growth By Monoterpenes *In Vitro*: Evidence of a Ras-Independent Mechanism of Action," *Anticancer Drugs* v. 7, no.4, 422-429) và ức chế sự phát triển của khối u cấy ghép (Yu, S. G., P. J. Anderson và C. E. Elson, 1995, "The Efficacy of B-ionone in the Chemoprevention of Rat Mammary Carcinogenesis," *J. Agri. Food Chem.* v. 43, 2144-2147).

Còn phát hiện được terpen có khả năng ức chế sự phát triển *in vitro* của vi khuẩn và nấm mốc (Chaumont J. P. and D. Leger, 1992, "Campaign Against Allergic Moulds in Dwellings, Inhibitor Properties of Essential Oil Geranium "Bourbon," Citronellol, Geraniol and Citral," *Ann. Pharm. Fr* v. 50, no.3, 156-166), và một số ký sinh vật nội sinh và vật ký sinh ngoại sinh (Hooser, S. B., V. R. Beasley and J. J. Everitt, 1986, Effects of an Insecticidal Dip Containing D-limonene in the Cat, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 189, no.8, 905-908). Geraniol được phát hiện là có khả năng ức chế sự phát triển của chủng *Candida albicans* và *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách tăng tốc độ thoát kali và phá vỡ trạng thái lỏng của màng (Bard, M., M. R. Albert, N. Gupta, C. J. Guuynn and W. Stillwell, 1988, Geraniol Interferes with Membrane Functions in Strains of *Candida* and *Saccharomyces*, *Lipids* v. 23, no.6, 534-538). B-ionon có hoạt tính chống nấm do xác định được bởi tác dụng ức chế sự nảy mầm của bào tử và ức chế sự phát triển trong aga (Mikhlin E. D., V. P. Radina, A. A. Dmitrossky, L. P. Blinkova, and L. G. Button, 1983, Antifungal and Antimicrobial Activity of Some Derivatives of Beta-Ionone and Vitamin A, *Prikl Biokhim Mikrobiol*, v. 19, 795-803; Salt, S. D., S. Tuzun and J. Kuc, 1986, Effects of B-ionone and Abscissic Acid on the Growth of Tobacco and Resistance to Blue Mold, Mimicry the Effects of Stem Infection by *Peronospora Tabacina*, *Adam Physiol. Molec. Plant Path* v.28, 287-297). Terpenon (geranylgeranylaxeton) có tác dụng kháng

khủng đối với *H. pylori* (Ishii, E., 1993, Antibacterial Activity of Terpenone, a Non Water-Soluble Antiulcer Agent, Against Helicobacter Pylori, *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* v.280, no.1-2, 239-243). Dung dịch chứa 11 loại terpen khác nhau có tác dụng hữu hiệu trong việc ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh trong các thử nghiệm *in vitro* (Kim, J., M. Marshall and C. Wei, 1995, Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components Against Five Foodborne Pathogens, *J. Agric. Food Chem.* v.43, 2839-2845). Điterpen, tức là trichorabđal A (từ *R. Trichocarpa*), có tác dụng kháng khuẩn rất mạnh đối với *H. pylori* (Kadota, S., P. Basnet, E. Ishii, T. Tamura and T. Namba, 1997, Antibacterial Activity of Trichorabđal A from *Rabdosia Trichocarpa* Against Helicobacter Pylori, *Zentralbl. Bakteriologie* v.287, no.1 63-67). Owawunmi, 1989 (Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citral, *Letters in Applied Microbiology* v. 9, no.3, 105-108), cho thấy môi trường sinh trưởng chứa xitral với lượng lớn hơn 0,01% có thể làm giảm mật độ *E. coli*, và với nồng độ 0,08% có tác dụng diệt khuẩn. Patent Mỹ số 5,673,468 bộc lộ chế phẩm terpen, trên cơ sở dầu thông, được sử dụng làm chất sát trùng hoặc chất tẩy rửa sát trùng. Patent Mỹ số 5,849,956 bộc lộ terpen phát hiện được ở cây lúa có hoạt tính chống nấm. Patent Mỹ số 5,939,050 bộc lộ sản phẩm kháng khuẩn vệ sinh răng miệng chứa hỗn hợp gồm 2 hoặc 3 terpen có tác dụng hiệp đồng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm cải thiện tác dụng diệt vi khuẩn của các axit hữu cơ đối với thức ăn gia súc bằng cách đưa aldehyt trans-2-hexenal vào với lượng ít nhất là 10% trọng lượng, tính theo tổng trọng lượng của các axit hữu cơ. Chế phẩm kháng khuẩn này có thể là dung dịch nước chứa một axit hữu cơ hoặc hỗn hợp gồm một số axit hữu cơ, kết hợp với aldehyt.

Chế phẩm này có thể còn chứa chất hoạt động bề mặt không ion đã được etoxy hóa.

Chế phẩm này có thể còn chứa terpen kháng khuẩn hoặc tinh dầu.

Các axit hữu cơ có thể có chiều dài mạch gồm 1 đến 24 nguyên tử cacbon, và có thể là bão hoà, chưa bão hoà, mạch vòng và có thể được thế bằng các nhóm chức chứa gốc halo, hydroxyl, amino, ete hoặc este.

Chất hoạt động bề mặt có thể là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa có HLB (hệ số cân bằng nhóm ưa nước-ky nước) nằm trong khoảng từ 4 đến 18. Chế phẩm này có thể còn chứa các chất hoạt động bề mặt khác không ion, ion hoặc lưỡng tính hoặc các chất hoạt động bề mặt khác có các đặc tính tương tự như Tween.

Terpen của chế phẩm này có thể bao gồm allyl disulfua, thymol, xitral, eugenol, carvacrol, limonen và carvon, hoặc hỗn hợp của chúng.

Ngoài trans-2-hexenal, chế phẩm này có thể chứa aldehyt dễ bay hơi thu được từ chu trình lipoxylaza bao gồm (2E, 6Z)-nonadienal, trans-2-nonenal, và các aldehyt béo chưa bão hoà α,β khác, nghĩa là propenal, trans-2-butenal, 2-metyl-2-butenal, 2-metyl-(E)-2-butenal, 2-pentenal, trans-2-hexen-1-ol, 2-metyl-2-pentanal, 2-isopropylpropenal, 2-etyl-2-butenal, 2-etyl-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, 3,7-đimetyl-6-octenal, 3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2E)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2Z)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, trans-2-nonenal, (2E,6Z)-nonadienal, 10-undecanal, 2-dodecenal và các aldehyt béo chưa bão hoà α,β khác có đặc tính kháng khuẩn và hương vị cũng như các dạng rượu và axit tương ứng của chúng.

Hỗn hợp theo sáng chế chứa axit hữu cơ với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 90% trọng lượng và trans-2-hexenal với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 99%.

Hỗn hợp này có thể chứa axit axetic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit butyric với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit propionic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit pelargonic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 40% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit formic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit succinic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit lauric với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit myristic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 5% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit caprylic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 20% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa axit levulinic với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 20% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa aldehyt béo chưa bão hoà α, β dễ bay hơi với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 90% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 30% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa terpen với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 50% trọng lượng theo thể tích, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 7% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa terpen kháng khuẩn với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 7% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 20% trọng lượng theo thể tích, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng.

Hỗn hợp này có thể chứa chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 1 đến 200 phân tử etylen với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 5,0% trọng lượng.

Hỗn hợp theo sáng chế có thể chứa chất hoạt động bề mặt có các đặc tính như các đặc tính của chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 5,0% trọng lượng

Hỗn hợp theo sáng chế có thể chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 97% trọng lượng, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 20% trọng lượng

Chế phẩm này có hiệu lực chống các loại nấm mốc khác nhau có mặt trong thức ăn gia súc và các thành phần chính của thức ăn gia súc.

Chế phẩm này có hiệu lực chống các loại vi khuẩn khác nhau có mặt trong thức ăn gia súc và các thành phần chính của thức ăn gia súc.

Chế phẩm này có hiệu lực chống các loại vi khuẩn và nấm mốc khác nhau có mặt trong nước.

Chế phẩm này có hiệu lực chống các vi sinh vật có hại cho việc sản xuất rượu từ quá trình lên men của xenluloza, tinh bột hoặc đường.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp xử lý thức ăn gia súc, bao gồm các bước: trộn thức ăn gia súc với lượng hữu hiệu của chế phẩm kháng khuẩn chứa axit hữu cơ có 1 đến 24 nguyên tử cacbon với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 90% trọng lượng, tính theo tổng trọng lượng, aldehyt béo chưa bão hoà α, β , ví dụ, trans-2-hexenal, với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng, tính theo tổng trọng lượng, với điều kiện nó cấu thành ít nhất 5% trọng lượng của hỗn hợp axit hữu cơ và aldehyt, terpen với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 30% trọng lượng, tính theo tổng trọng lượng, chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 10% trọng lượng, tính theo tổng trọng lượng, và nước.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

“Phần trăm thể tích” của một thành phần là dựa trên tổng thể tích của chế phẩm hoặc hợp phần chứa thành phần này.

“Axit hữu cơ” của chế phẩm này có thể là axit formic, axetic, propionic, butyric, pelargonic, lactic và các axit béo khác có 2 đến 24 nguyên tử cacbon hoặc mono-, di-, hoặc triglyxerit chứa axit béo có 1 đến 24 nguyên tử cacbon. Các axit béo này bao gồm axit béo mạch ngắn, mạch trung bình, mạch dài hoặc các triglyxerit mạch ngắn, mạch trung bình, mạch dài.

Aldehyt béo chưa bão hoà α,β của chế phẩm này có thể là propenal, trans-2-butenal, 2-metyl-2-butenal, 2-metyl-(E)-2-butenal, trans-2 hexenal, 2-pentenal, trans-2-hexen-1-ol, 2-metyl-2-pentanal, 2-isopropylpropenal, 2-etyl-2-butenal, 2-etyl-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, 3,7-đimetyl-6-octenal, 3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2E)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, (2Z)-3,7-đimetyl-2,6-octadienal, trans-2-nonenal, (2E,6Z)-nonadienal, 10-undecanal, 2-dodexenal và các aldehyt béo chưa bão hoà α,β khác có đặc tính kháng khuẩn và hương vị cũng như các dạng rượu và axit tương ứng của chúng.

“Terpen kháng khuẩn” của chế phẩm này có thể bao gồm alyl disulfua, xitral, pinen, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, anethol, camphor, menthol, limonen, farnesol, caroten, thymol, borneol, myrxen, terpen, linalool, hoặc hỗn hợp của chúng. Cụ thể hơn, terpen có thể bao gồm alyl disulfua, thymol, xitral, eugenol, limonen, carvacrol, và carvon, hoặc hỗn hợp của chúng.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" của hợp chất có nghĩa là lượng có khả năng thực hiện chức năng của hợp chất hoặc đặc tính mà lượng hữu hiệu biểu hiện, như lượng đủ nhưng không độc để tạo ra tác dụng kháng khuẩn mong muốn. Do vậy, lượng hữu hiệu phù hợp có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật xác định chỉ bằng cách áp dụng các thử nghiệm thông thường.

Các chế phẩm có thể thay đổi không những nồng độ của các thành phần chính, tức là các axit hữu cơ, mà còn cả loại aldehyt, terpen, các chất hoạt động bề mặt và hàm lượng nước được sử dụng. Sáng chế này có thể được cải biến theo một vài cách bằng cách bổ sung vào hoặc loại bỏ ra khỏi chế phẩm terpen, loại axit hữu cơ, aldehyt và loại chất hoạt động bề mặt.

Thuật ngữ “tác dụng hiệp đồng” hoặc “sự hiệp đồng” có nghĩa là tác dụng bảo quản được cải thiện khi các thành phần được bổ sung vào ở dạng hỗn hợp chứ không phải ở dạng các thành phần riêng biệt.

Chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế chứa lượng hữu hiệu của các axit hữu cơ có 1 đến 24 nguyên tử cacbon và aldehyt béo chưa bão hoà α,β , ví dụ, trans-2-hexenal.

Terpen kháng khuẩn, chất chiết thực vật hoặc tinh dầu chứa terpen có thể được sử dụng, cũng như terpen đã tinh chế. Terpen là sẵn có trên thị trường hoặc có thể được tạo ra theo phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như chiết bằng dung môi hoặc chiết/chưng cất hơi và tổng hợp hóa học.

Chất hoạt động bề mặt là loại không ion kể cả chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 1 đến 2000 liên kết polyetylen, tốt hơn nữa là 20 đến 100 liên kết polyetylen.

Chế phẩm được ưu tiên chứa axit hữu cơ với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 90% trọng lượng và trans-2-hexenal với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 30%, trong đó axit hữu cơ có thể là axit axetic với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng, axit propionic với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng, axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 40% trọng lượng, hoặc axit pelargonic với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% trọng lượng, và hỗn hợp của chúng. Chế phẩm được ưu tiên có thể còn chứa terpen với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 7% trọng lượng, chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng và nước với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% trọng lượng.

Phương pháp

Chế phẩm theo sáng chế có hiệu lực chống vi khuẩn và nấm. Chế phẩm này có thể được sử dụng ở dạng tạo ra sự phân bố hỗn hợp một cách đồng đều và đồng nhất trong thức ăn gia súc.

Chế phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được cho nước.

Chế phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được cho nguyên liệu thô trước khi vào máy khuấy.

Chế phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được cho nguyên liệu thô chưa trộn trong máy khuấy.

Chế phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được trong quá trình trộn các thành phần thô.

Chế phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được bằng vòi phun.

Một trong số các mục đích là kiểm soát hàm lượng vi sinh vật trong thức ăn gia súc và thành phần thức ăn gia súc. Một vài hỗn hợp gồm các axit hữu cơ, terpen và aldehyt tạo ra các chế phẩm có hiệu lực chống vi khuẩn trong dung dịch đậm và thức ăn gia súc. Mục đích khác là tạo ra chế phẩm kháng khuẩn bằng các hợp chất có trong tự nhiên hoặc các hợp chất an toàn để sử dụng. Toàn bộ các hóa chất được sử dụng theo sáng chế hiện đều được chấp thuận dùng làm chất kháng khuẩn, chất tăng cường mùi thơm và chất tạo hương thơm để dùng cho người.

Đã thu được kết quả bất ngờ, tức là tác dụng hiệp đồng ngoài tác dụng cộng hợp, khi trans-2-hexenal được bổ sung vào các axit hữu cơ và terpen.

Trong bản mô tả này có trích dẫn các tài liệu công bố khác nhau, tất cả các tài liệu này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 và Ví dụ 2

Quy trình: Các chế phẩm sau được điều chế cho các thử nghiệm *in vitro* lặp lại. Tất cả các chất phản ứng có độ tinh khiết cao nhất và là loại dùng trong phòng thí nghiệm. Đối với axit axetic, dung dịch 56% được điều chế. Axit succinic được pha loãng trong nước thành dung dịch 5% do vấn đề về độ hòa tan. Hai sản phẩm thương mại, hỗn hợp axit formic/axit propionic và hỗn hợp formaldehyt/axit propionic, được thử nghiệm nhằm mục đích so sánh.

Các chế phẩm hóa học cho Ví dụ 1 và 2												
Hóa chất	% hóa chất trong chế phẩm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eugenol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
Carvacrol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
CO60* (chất hoạt động bề mặt)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0
Axit pelargonic	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0
Axit axetic (56%)	22,5	32,5	22,5	22,5	22,5	37,5	22,5	12,5	32,5	12,5	0	0
Axit lactic	20,0	0	0	0	0	0	0	10,0	40,0	0	0	0
Axit propionic	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	50,0	0	40,0	42,5	10,0
Axit formic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70,0
Axit succinic (5%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20,0	30,0	0
Axit lauric	0	0	0	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0
Axit myristic	0	0	0	0	0	5,0	0	0	0	0	0	0
Axit caprylic	0	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0	0	0
Axit levulinic	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0	0	0	20,0
trans-2-hexenal	0	10,0	20,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

*CO-60 là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 60 đơn vị etylen.

Huyền phù chứa *Salmonella typhimurium* được cho vào hai ống nghiệm chứa từng chế phẩm với lượng 0,05% (500ppm). Các ống nghiệm này được khuấy xoáy, ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 24 giờ và sau đó dung dịch này được dàn mỏng trên đĩa SMA (Standard Methods Agar) trong thời gian 48 giờ trước khi đếm số lượng khuẩn lạc *Salmonella*.

Kết quả: bảng sau cho thấy rằng một số chế phẩm có hiệu lực kiểm soát sự phát triển của *Salmonella*.

Kết quả: Thử nghiệm 1 và thử nghiệm 2.

24giờ cfu/ml (0,05%)				
Xử lý	Thử nghiệm 1	% giảm	Thử nghiệm 2	% giảm
Đối chứng	1093		1900	
Công thức 1	0	100,0	37	98,1
Công thức 2	7	99,4	10	99,5
Công thức 3	13	98,8	0	100,0
Công thức 4	33	97,0	130	93,2
Công thức 5	27	97,5	133	93,0
Công thức 6	83	92,4	163	91,4
Công thức 7	143	86,9	240	87,4
Công thức 8	20	98,2	70	96,3
Công thức 9	3	99,7	0	100,0
Công thức 10	147	86,6	160	91,6
Công thức 11	197	82,0	283	85,1
Công thức 12	0	100,0	0	100,0
Axit formic/propionic	0	100,0	0	100,0
Formaldehyt (33%)	0	100,0	0	100,0

Kết luận: Các chế phẩm gây ra đáp ứng khác nhau với Salmonella. Các chế phẩm có lượng trans-2-hexenal và axit lactic cao hơn có hiệu quả tốt hơn tất cả các chế phẩm khác ngoại trừ các sản phẩm trên cơ sở formaldehyt và axit formic.

Ví dụ 3

Quy trình: Từ các thử nghiệm *in vitro* nêu trên, sáu chế phẩm được chọn để thử nghiệm hiệu lực chống Salmonella trong thức ăn gia súc. Hỗn hợp formaldehyt/axit propionic

được thử nghiệm nhằm mục đích so sánh. Cám gia cầm được thay đổi bằng bột xương và thịt được cấy *Salmonella typhimurium*. Sau đó, thức ăn gia súc đã bị nhiễm tạp được xử lý bằng các chế phẩm liệt kê dưới đây với lượng 1kg/MT, 2kg/MT và 3kg/MT. Sau 24 giờ, 10g mẫu con thức ăn gia súc đã được xử lý được tạo hỗn dịch trong 90ml dung dịch đệm Butterfield. Các dịch pha loãng được dàn mỏng trên aga XLT-4 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trước khi đếm số khuẩn lạc *Salmonella*. Các chế phẩm được sử dụng cho thử nghiệm này được thể hiện trong bảng sau.

Các chế phẩm hóa học cho Ví dụ 3						
Hóa chất	% hóa chất trong chế phẩm					
Chế phẩm	1	2	3	8	9	12
Eugenol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
Carvacrol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
CO60*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0
Axit pelargonic	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	0
Axit axetic (56%)	22,50	32,50	22,50	12,50	32,50	0
Axit lactic	20,00	0	0	10,00	40,00	0
Axit propionic	30,00	30,00	30,00	50,00	0	10,00
Axit formic	0	0	0	0	0	70,00
Axit levulinic	0	0	0	0	0	20,00
trans-2-hexenal	0	10,00	20,00	0	0	0
Tổng	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 60 đơn vị etylen.

Kết quả: bảng sau cho thấy rằng một số chế phẩm có tác dụng kiểm soát sự sinh trưởng của Salmonella.

Xử lý	Kg/MT	cfu/g	% giảm
Công thức 1	0	2540	
	1	2010	21
	2	1730	32
	3	1385	45
Công thức 2	0	1860	
	1	895	52
	2	583	69
	3	273	85
Công thức 3	0	2220	
	1	815	63
	2	420	81
	3	80	96
Công thức 8	0	2080	
	1	1670	20
	2	1540	26
	3	1325	36
Công thức 9	0	2005	
	1	1313	34
	2	1470	27
	3	1150	43
Công thức 12	0	2080	
	1	1010	51
	2	230	89
	3	93	96
Formaldehyt (33%)	0	1180	
	1	0	100
	2	0	100
	3	0	100

Kết luận: Các công thức chứa trans-2-hexenal thể hiện hiệu lực chống Salmonella mạnh hơn. Các chế phẩm chứa trans-2-hexenal với hàm lượng cao có hiệu lực tương tự như các sản phẩm trên cơ sở formaldehyt (33% formaldehyt) và axit formic .

Ví dụ 4

Quy trình: Năm chế phẩm được chọn để thử nghiệm hiệu lực chống *Salmonella typhimurium*. Cám gia cầm được thay đổi bằng bột xương và thịt được cấy *Salmonella typhimurium*. Sau đó, thức ăn gia súc đã bị nhiễm tạp được xử lý bằng các chế phẩm liệt kê dưới đây với lượng 1kg/MT, 2kg/MT và 3kg/MT. Sau 24 giờ, 10g mẫu con thức ăn gia súc đã được xử lý được tạo huyền phù trong 90ml dung dịch đệm Butterfield. Các dịch pha loãng được dàn mỏng trên aga XLT-4 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trước khi đếm số khuẩn lạc *Salmonella*. Các mẫu bổ sung được lấy 7 ngày và 14 ngày sau khi xử lý để đếm *Salmonella*. Các chế phẩm đã sử dụng được thể hiện trong bảng sau.

Các chế phẩm hóa học cho Ví dụ 4					
Hóa chất	% hóa chất trong chế phẩm				
	16	17	18	19	20
Eugenol	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
Carvacrol	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
CO60*	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
Axit pelargonic	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Axit axetic (56%)	30,00	45,00	20,00	47,50	53,00
Axit propionic	20,00	20,00	50,00	26,00	24,00
Trans-2-hexenal	30,00	30,00	25,00	20,00	15,00
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 60 đơn vị etylen.

Kết quả: bảng sau thể hiện một số chế phẩm có hiệu lực kiểm soát *Salmonella*.

Tác dụng của các hóa chất đối với Salmonella vào ngày 1, 7 và 14 sau khi xử lý							
Công thức	Tỷ lệ xử lý	Salmonella vào thời điểm 24 giờ		Salmonella vào thời điểm 7 ngày		Salmonella vào thời điểm 14 ngày	
	Kg/MT	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm
Công thức #16	0	1,2E+05		1,8E+05		6,4E+04	
	1	2,8E+04	77	2,3E+04	86,9	1,5E+04	77,1
	2	1,2E+04	90	6,3E+03	96,4	4,3E+03	93,2
	3	2,0E+03	98	1,0E+03	99,4	3,3E+02	99,5
Công thức #17	0	1,5E+05		1,5E+05		1,4E+05	
	1	5,0E+04	66	3,5E+04	76,9	3,5E+04	75,8
	2	1,4E+04	91	6,0E+03	96,0	2,3E+03	98,4
	3	3,3E+02	100	3,3E+02	99,8	1,0E+03	99,3
Công thức #18	0	1,3E+05		1,5E+05		1,4E+05	
	1	3,7E+04	72	2,7E+04	82,3	2,5E+04	81,4
	2	7,3E+03	94	1,2E+04	92,1	7,7E+03	94,4
	3	7,3E+03	94	3,3E+03	97,8	6,7E+02	99,5
Công thức #19	0	1,4E+05		1,8E+05		8,2E+04	
	1	5,5E+04	59	7,2E+04	60,8	2,7E+04	66,9
	2	6,3E+03	95	2,0E+04	88,9	1,1E+04	86,5
	3	3,7E+03	97	4,0E+03	97,8	6,3E+03	92,2
Công thức #20	0	1,3E+05		2,0E+05		8,0E+04	
	1	6,5E+04	48	7,5E+04	62,4	4,0E+04	49,8
	2	2,8E+04	77	2,7E+04	86,4	1,2E+04	85,5
	3	9,7E+03	92	1,4E+04	93,2	1,0E+04	87,6

Kết luận: tất cả các chế phẩm đều làm giảm số lượng Salmonella trong thức ăn gia súc. Các chế phẩm chứa trans-2-hexanal với lượng thấp (< 15%) là không hữu hiệu như các chế phẩm khác.

Ví dụ 5

Quy trình: Các chế phẩm #17 và #18 chứa trans-2-hexenal được so sánh với sáu chế phẩm khác chứa aldehyt với lượng ít hơn nhưng chứa axit lactic với lượng nhiều hơn. Cám gia cầm được sửa đổi bằng bột xương và thịt được cấy *Salmonella typhimurium*. Sau đó, thức ăn gia súc đã bị nhiễm tạp được xử lý bằng các chế phẩm liệt kê dưới đây

với lượng 1kg/MT, 2kg/MT và 3kg/MT. Sau 24 giờ, 10g mẫu con của thức ăn gia súc đã được xử lý được tạo huyền phù trong 90ml dung dịch đệm Butterfield. Các dung dịch pha loãng được dàn mỏng trên aga XLT-4 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trước khi đếm số khuẩn lạc Salmonella. Các mẫu bổ sung được lấy 7 ngày và 14 ngày sau khi xử lý để đếm Salmonella. Các chế phẩm được sử dụng được thể hiện trong bảng sau.

Các chế phẩm hóa học cho Ví dụ 5								
Hóa chất	% hóa chất trong chế phẩm							
Chế phẩm	17	18	21	22	23	24	25	26
Eugenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00
Carvacrol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00
CO-60*	0,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00	8,00	0,00
Axit pelargonic	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
Axit axetic (56%)	45,00	20,00	38,00	40,00	35,00	30,00	36,00	0,00
trans-2-hexenal	30,00	25,00	5,00	5,00	5,00	10,00	10,00	0,00
Axit propionic	20,00	50,00	12,00	15,00	10,00	10,00	15,00	10,00
Lactic	0,00	0,00	40,00	30,00	40,00	38,50	26,00	0,00
Axit formic (88%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	90,00
Tổng	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 60 đơn vị etylen.

Kết quả: bảng sau cho thấy rằng một số chế phẩm có hiệu lực kiểm soát Salmonella.

Tác dụng của các hóa chất với Salmonella vào ngày 1, 7 và 14 sau khi xử lý							
Xử lý	Tỷ lệ xử lý	Salmonellavào thời điểm 1 ngày		Salmonellavào thời điểm 7 ngày		Salmonella vào thời điểm 14 ngày	
	kg/MT	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm	cfu/g thức ăn gia súc	% giảm
Công thức #17	0	1,75E+05		1,11E+05		1,07E+04	
	1	3,93E+04	77,52	2,67E+03	97,60	3,33E+03	68,75
	2	1,00E+03	99,43	3,33E+02	99,70	1,00E+03	90,63
	3	6,70E+02	99,62	0,00E+00	100,00	6,67E+02	93,75
Công thức #18	0	1,87E+05		6,77E+04		8,33E+03	
	1	7,07E+04	62,21	1,13E+04	83,25	1,00E+03	88,00
	2	9,67E+03	94,83	4,00E+03	94,09	3,33E+02	96,00
	3	6,00E+03	96,79	6,67E+02	99,01	0,00E+00	100,00
Công thức #21	0	1,17E+05		1,31E+05		1,40E+04	
	1	6,60E+04	43,59	3,40E+04	74,05	7,33E+03	47,62
	2	2,30E+04	80,34	2,30E+04	82,44	3,50E+03	75,00
	3	8,67E+03	92,59	8,67E+03	93,38	1,33E+03	90,48
Công thức #22	0	2,30E+05		2,08E+05		7,00E+03	
	1	1,65E+05	28,41	4,13E+04	80,13	3,33E+03	52,38
	2	6,97E+04	69,71	1,30E+04	93,75	1,50E+03	78,57
	3	2,13E+04	90,72	4,33E+03	97,92	1,00E+03	85,71
Công thức #23	0	1,13E+05		1,66E+05		5,33E+03	
	1	1,01E+05	10,88	7,07E+04	57,52	2,00E+03	62,50
	2	5,95E+04	47,50	2,83E+04	82,97	1,33E+03	75,00
	3	3,00E+04	73,53	5,67E+03	96,59	1,00E+03	81,25
Công thức #24	0	1,75E+05		9,70E+04		5,00E+03	
	1	5,73E+04	67,14	3,70E+04	61,86	1,00E+03	80,00
	2	3,10E+04	82,23	1,27E+04	86,94	1,00E+03	80,00
	3	2,20E+04	87,39	4,00E+03	95,88	6,67E+02	86,67
Công thức #25	0	2,36E+05		8,20E+04		2,27E+04	
	1	1,11E+05	52,97	2,37E+04	71,14	6,67E+03	70,59
	2	9,13E+04	61,30	7,00E+03	91,46	4,00E+03	82,35
	3	4,10E+04	82,63	3,00E+03	96,34	6,67E+02	97,06
Công thức #26	0	1,53E+05		5,15E+04		1,13E+04	
	1	8,40E+04	45,10	1,17E+04	77,35	3,67E+03	67,65
	2	3,37E+04	78,00	6,00E+03	88,35	2,33E+03	79,41
	3	1,53E+04	89,98	6,67E+02	98,71	1,33E+03	88,24

Kết luận: Bằng cách giảm hàm lượng trans-2-hexenal (đến lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 25%) và tăng hàm lượng axit lactic (đến lượng nằm trong khoảng từ 26% đến 40%), đạt được đáp ứng tương tự như đáp ứng của chế phẩm chứa trans-2-hexenal với hàm lượng cao (30%).

Ví dụ 6

Quy trình: Bốn trong số bảy chế phẩm được thử nghiệm trong Ví dụ 5 thể hiện hiệu lực thỏa đáng chống *Salmonella typhimurium*. Chế phẩm mới (công thức 27) và chất kháng khuẩn trên cơ sở formaldehyt (33% formaldehyt) được thử trong thử nghiệm này. Cám gia cầm được sửa đổi bằng bột xương và thịt cây *Salmonella typhimurium*. Sau đó, thức ăn gia súc đã bị nhiễm tạp được xử lý bằng các chế phẩm liệt kê dưới đây với lượng 1kg/MT, 2kg/MT và 3kg/MT. Sau 24 giờ, 10g mẫu con của thức ăn gia súc đã được xử lý được tạo huyền phù trong 90ml dung dịch đệm Butterfield. Các dịch pha loãng được dàn mỏng trên aga XLT-4 và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trước khi đếm số khuẩn lạc *Salmonella*. Các mẫu bổ sung được lấy vào thời điểm 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày sau khi xử lý để đếm *Salmonella*. Các chế phẩm được sử dụng được thể hiện trong bảng sau.

Các chế phẩm hóa học cho Ví dụ 6						
Hóa chất	% hóa chất trong chế phẩm					
Chế phẩm	17	18	22	25	27	HCHO
CO60*	0,00	0,00	5,00	8,00	10,00	0,00
Axit pelargonic	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
Axit axetic (56%)	45,00	20,00	40,00	36,00	40,00	0,00
trans-2-hexenal	30,00	25,00	5,00	10,00	5,00	0,00
Axit propionic	20,00	50,00	15,00	15,00	10,00	10,00
Lactic	0,00	0,00	30,00	26,00	30,00	0,00
Formaldehyt (37%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	90,00
Tổng	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa 60 đơn vị etylen.

Kết quả: Bảng sau cho thấy rằng một số chế phẩm có hiệu lực kiểm soát Salmonella

Tác dụng của các hóa chất với Salmonella vào ngày 1, 7 và 14 sau khi xử lý									
Xử lý	Tỷ lệ	Salmonella vào thời điểm 24 giờ		Salmonella vào thời điểm ngày thứ 7		Salmonella vào thời điểm ngày thứ 14		Salmonella vào thời điểm ngày thứ 21	
Công thức	Liều lượng kg/MT	cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
17	0	56408		11969		25889		4150	
	1	14600	74,1	4550	62,0	11400	56,0	1633	60,7
	2	3900	93,1	1400	88,3	4833	81,3	267	93,6
	3	2900	80,1	1150	90,4	1300	95,0	0	100,0
18	0	56408		11969		25889		4150	
	1	18400	67,4	2200	81,6	10533	59,3	1300	68,7
	2	5400	90,4	2900	75,8	5133	80,2	200	95,2
	3	1800	96,8	1317	89,0	1767	93,2	33	99,2
22	0	56408		11969		25889		4150	
	1	43000	23,8	10217	14,6	17667	31,8	2567	38,1

	2	31000	45,0	6450	46,1	15167	41,4	800	80,7
	3	26600	52,8	2133	82,2	11500	55,6	233	94,4
25	0	56408		11969		25889		4150	
	1	19450	65,5	7217	39,7	13233	48,9	1300	68,7
	2	9500	83,2	1967	83,6	9333	63,9	367	91,2
	3	5900	89,5	767	93,6	8867	65,7	450	89,2
27	0	56408		11969		25889		4150	
	1	33000	41,5	10017	16,3	13600	47,5	633	84,7
	2	24150	57,2	9367	21,7	11933	53,9	367	91,2
	3	17150	69,6	4983	58,4	7367	71,5	267	93,6
HCHO*	0	56408		11969		25889			
	1	150	99,7	0	100,0	0	100,0		
	2	150	99,7	0	100,0	0	100,0		
	3	0	100,0	0	100,0	0	100,0		

*hỗn hợp formaldehyt (33%)/propionic

Kết luận: tất cả các chế phẩm đều có hiệu lực cao hơn 90% vào thời điểm 2 hoặc 3 tuần sau khi xử lý.

Ví dụ 7

Thử nghiệm xác định xem chế phẩm Công thức #18 có còn hoạt tính dư sau khi xử lý hay không. Thức ăn gia cầm thương phẩm được nghiền bằng máy nghiền Romer đến cỡ hạt mịn để đảm bảo trộn giống cây một cách đồng nhất vào thức ăn gia súc. Thức ăn gia súc (mẫu con 1kg) được đưa vào bình thủy tinh dung tích 1 gallon (3,78 lit) được chỉ định một cách ngẫu nhiên cho các xử lý. Các chất trong bình thủy tinh dung tích 1 gallon (3,78 lit) được cho vào máy khuấy thức ăn gia súc dùng trong phòng thí nghiệm và trộn trong thời gian 1 đến 2 phút, trước khi xử lý bằng chế phẩm Công thức #18 với lượng bằng 0kg/tấn, 1kg/tấn, 2kg/tấn, hoặc 3kg/tấn. Tiến hành thêm một bản sao cho mỗi nồng độ xử lý. Sau khi xử lý, thức ăn gia súc được cho nhiễm lại với 10g giống cây Salmonella và trộn thêm trong thời gian 2 đến 3 phút. Các chất bên trong máy khuấy được đưa vào bình thủy tinh dung tích 1 gallon ban đầu, đậy nắp và để yên trong thời gian 1 ngày ở nhiệt độ trong phòng (23°C đến 24°C). Các mẫu thức ăn gia súc (ba mẫu con 10g/xử lý) được lấy vào thời điểm 24 giờ, 7 ngày và 14 ngày sau khi nhiễm lại bằng cách áp dụng các kỹ thuật vô trùng. Các mẫu con này được đưa vào chai pha loãng chứa 100ml dung

dịch đệm Butterfield. Các dịch pha loãng tuần tự được dàn mỏng trên 2 đĩa aga XLT-4 riêng biệt. Các đĩa aga được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trước khi đếm Salmonella.

Nồng độ Salmonella trong ba mẫu/xử lý lặp lại vào các thời điểm khác nhau được tính trung bình và được nêu trong bảng sau.

% hiệu lực chống nhiễm lại Salmonella			
Công thức # 18 (liều lượng)	Ngày 1	Ngày 7	Ngày 14
1kg/MT	63	70	54
2kg/ MT	75	45	87
3kg/ MT	82	73	98

Quan sát thấy rằng chế phẩm Công thức #18 duy trì được mức độ hữu hiệu vào thời điểm 14 ngày sau khi thức ăn gia súc nhiễm Salmonella.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy rằng có thể thực hiện nhiều biến đổi và cải biến trong sáng chế mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế. Cũng dự tính rằng bản mô tả và các ví dụ chỉ nhằm mục đích làm ví dụ chứ không nhằm mục đích giới hạn, và phạm vi của sáng chế được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm kháng khuẩn chứa:

một hoặc hỗn hợp gồm các axit hữu cơ được chọn từ nhóm gồm axit axetic, axit propionic, axit lactic, axit pelargonic, hoặc hỗn hợp của chúng, với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 90%;

trans-2-hexenal, với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55%;

terpen, với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 30%;

chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0% đến 10%; và nước;

trong đó, tỷ lệ phần trăm các thành phần được tính theo tổng trọng lượng.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa:

terpen với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 7% trọng lượng;

chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa có HLB (hệ số cân bằng nhóm ưa nước-kỵ nước) nằm trong khoảng 4 đến 18.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt dầu thầu dầu đã được etoxy hóa chứa từ 1 đến 200 phân tử etylen.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó terpen được chọn từ nhóm bao gồm alyl disulfua, xitral, pinen, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, anethol, camphor, menthol, limonen, farnesol, caroten, thymol, borneol, myrxen, terpen, linalool, và hỗn hợp của chúng.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa axit pelargonic với lượng 5% trọng lượng, axit axetic với lượng nằm trong khoảng từ 11% đến 25% trọng lượng, axit propionic với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 50% trọng lượng và trans-2-hexenal với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 30% trọng lượng.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa axit pelargonic với lượng 5% trọng lượng, axit axetic với lượng 11% trọng lượng, axit propionic với lượng 50% trọng lượng và trans-2-hexenal với lượng 25% trọng lượng.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa axit axetic với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng, axit propionic với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 55% trọng lượng hoặc axit pelargonic với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% trọng lượng.
9. Phương pháp xử lý thức ăn gia súc bao gồm bước:
trộn thức ăn gia súc với lượng hữu hiệu của chế phẩm kháng khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 8.