



(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



1-0036266

(51)⁸ C12N 1/16; A61K 36/062; A61K 8/99; (13) B
C12R 1/645; C12P 1/02; C12P 7/62;
A23L 27/10; A61Q 13/00

(21) 1-2017-02661 (22) 18/01/2016
(86) PCT/JP2016/051232 18/01/2016 (87) WO2016/117489 28/07/2016
(30) 2015-008129 19/01/2015 JP
(45) 25/07/2023 424 (43) 25/10/2017 355A
(73) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, Japan
(72) IZAWA, Naoki (JP); KUDO, Miyuki (JP); SONE, Toshiro (JP).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) SẢN PHẨM NUÔI CÂY CHỨA VI SINH VẬT THUỘC CHI
WICKERHAMOMYCES VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐƯA HƯƠNG THƠM VÀO MỸ
 PHẨM, THỰC PHẨM, ĐỒ UỐNG HOẶC DƯỢC PHẨM

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm nuôi cấy chứa lượng lớn etyl benzoat và có hương trái cây phức hợp hơn và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học. Sản phẩm nuôi cấy này thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi Wickerhamomyces trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm, đồ uống và dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy này cũng như phương pháp đưa hương thơm vào mỹ phẩm, thực phẩm, đồ uống và dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm nuôi cấy có hương thơm dễ chịu và việc sử dụng sản phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phương pháp thu được sản phẩm nuôi cấy có hương thơm dễ chịu bằng cách sử dụng nấm men sản sinh ra các thành phần thơm khác nhau, chẳng hạn, *Saccharomyces cerevisiae* thường đã biết, và sản phẩm nuôi cấy thu được bằng phương pháp đó đã được sử dụng trong thực phẩm và đồ uống (tài liệu sáng chế 1 đến 3).

Etyl benzoat, một trong số các thành phần thơm, có thể được tổng hợp hóa học từ axit benzoic và etanol. Hợp chất này đã được biết đến là một trong số các thành phần thơm của quả khế và đã được sử dụng trong công nghiệp làm chất tạo hương nhân tạo đem lại mùi hương trái cây. Sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách sử dụng *Saccharomyces cerevisiae* và chứa etyl benzoat làm thành phần thơm là đã biết; tuy nhiên, hàm lượng etyl benzoat là thấp từ 0,006 đến 0,009 ppm (tài liệu 1).

Wickerhamomyces pijperi là nấm men mà trước đây gọi là *Pichia pijperi* và được phân loại lại là *Wickerhamomyces pijperi*. Tài liệu 2 mô tả phương pháp nuôi cấy nấm men này trong môi trường nuôi cấy chứa chất chiết nấm men-manitol và môi trường nuôi cấy chứa chất chiết nấm men-pepton-dextroza (yeast-peptone-dextrose - YPD); tuy nhiên, đặc trưng của sản phẩm nuôi cấy thu được bằng phương pháp này là chưa rõ và khả năng nuôi cấy *Wickerhamomyces pijperi* trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa và hương thơm của sản phẩm nuôi cấy thu được cũng hoàn toàn chưa rõ.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-H5-49465

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-2001-103959

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2012-55286

Tài liệu khác

Tài liệu 1: Journal of the Institute of Brewing, 116, 190-196, 2010

Tài liệu 2: Microbiology, 155, 3142-3148, 2009.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Sản phẩm tổng hợp hóa học chứa thành phần thơm đã mô tả trên đây như etyl benzoat có mùi nhẹ và nếu kết hợp trong chế phẩm tạo hương thì tất yếu chưa làm thỏa mãn nhu cầu. Do đó, có nhu cầu cung cấp chế phẩm mà có thể sử dụng trong mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, và dược phẩm, có hương thơm dễ chịu hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học, và có thể dùng làm chế phẩm tạo hương. Ngoài ra, nhiều người tiêu dùng thích hương trái cây và do đó có nhu cầu cung cấp hương trái cây mới.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm mới mà có thể dùng trong chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự, trong đó chế phẩm này chứa lượng lớn etyl benzoat và có hương trái cây phức hợp hơn và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học chứa etyl benzoat; và việc sử dụng chế phẩm này.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Do đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện nghiên cứu phạm vi rộng để phát triển chế phẩm có hương thơm dễ chịu và toàn hoàn bất ngờ đã phát hiện các vấn đề thực tế sau đây: thu được sản phẩm nuôi cấy chứa lượng lớn etyl benzoat đã biết là thành phần thơm và có hương trái cây phức hợp hơn và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học chứa etyl benzoat khi nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa; và sản phẩm nuôi cấy này hữu dụng như một sản phẩm nuôi cấy có thể được dùng trong chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự, và thực hiện sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các điểm từ (1) đến (10) sau đây:

(1) Sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa.

(2) Sản phẩm nuôi cấy theo điểm (1), trong đó môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa là môi trường nuôi cấy chứa nước sữa (whey).

(3) Sản phẩm nuôi cấy theo điểm (1) hoặc (2), trong đó vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* là *Wickerhamomyces pijperi*.

(4) Sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3), trong đó vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* là *Wickerhamomyces pijperi* NBRC1290 và/hoặc *Wickerhamomyces pijperi* NBRC1887.

(5) Sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (4), trong đó môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa còn chứa thêm axit benzoic và/hoặc muối của nó.

(6) Chế phẩm tạo hương chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5).

(7) Mỹ phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5).

(8) Thực phẩm hoặc đồ uống chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5).

(9) Dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5).

(10) Phương pháp đưa hương thơm vào mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc dược phẩm, bao gồm bước bổ sung sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5) vào chế phẩm này.

Hiệu quả của sáng chế

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế chứa lượng lớn etyl benzoat và có hương trái cây phức hợp hơn và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học chứa etyl benzoat. Do đó, sản phẩm nuôi cấy này hữu dụng làm sản phẩm nuôi cấy không chỉ dùng trong chế phẩm tạo hương và mỹ phẩm mà cả trong thực phẩm hoặc đồ uống và dược phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế là sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* bao gồm *Wickerhamomyces pijperi*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Wickerhamomyces bovis*, *Wickerhamomyces rabaulensis*, *Wickerhamomyces hampshirensis*, *Wickerhamomyces strasburgensis*,

Wickerhamomyces sydowiorum, *Wickerhamomyces lynferdii*, *Wickerhamomyces ciferrii*, *Wickerhamomyces chambardii*, *Wickerhamomyces silvicola*, *Wickerhamomyces bisporus*, *Wickerhamomyces alni*, *Wickerhamomyces canadensis*, *Wickerhamomyces onychis*, *Wickerhamomyces edaphicus*, và *Wickerhamomyces patagonicus*. Trong số đó *Wickerhamomyces pijperi* được ưu tiên. Ngoài ra, trong số các chủng *Wickerhamomyces pijperi*, chủng NBRC1290 và NBRC1887 được lưu giữ tại NBRC (NITE Biological Resource Center) được ưu tiên hơn. Các vi sinh vật này có thể được dùng đơn độc hoặc các vi sinh vật này có thể được dùng kết hợp. Trong ngữ cảnh này, vi sinh vật mà trước đây được phân loại là *Pichia pijperi* và có thể được phân loại lại là *Wickerhamomyces pijperi* cũng thuộc *Wickerhamomyces pijperi* theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "thành phần sữa" chỉ sữa nguyên chất, sữa đã xử lý bằng nhiệt, bột sữa đã tách béo, hoặc bột sữa nguyên kem từ sữa động vật như sữa bò, sữa dê, và sữa cừu, hoặc nguyên liệu chứa thành phần có nguồn gốc từ sữa, như kem tươi và nước sữa.

Môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa có thể là môi trường nuôi cấy bất kỳ chứa thành phần sữa và có thể chứa thêm các thành phần khác. Các ví dụ được ưu tiên về các thành phần khác như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, đường như glucoza, galactoza, lactoza, và fructoza, và axit benzoic và/hoặc muối của nó. Đường được ưu tiên là glucoza trong đó glucoza được sử dụng làm nguồn năng lượng cho vi sinh vật. Axit benzoic và/hoặc muối của nó được ưu tiên ở chỗ việc bổ sung chúng tăng cường hiệu suất tạo etyl benzoat của vi sinh vật. Muối của axit benzoic được ưu tiên hơn là muối kim loại kiềm của axit benzoic như natri benzoat và kali benzoat, và còn được ưu tiên Ngoài ra là natri benzoat. Do đó, tốt hơn là bổ sung axit benzoic và/hoặc natri benzoat làm axit benzoic và/hoặc muối của nó.

Thành phần sữa đặc biệt được ưu tiên là nước sữa vì nước sữa tăng cường hiệu suất tạo etyl benzoat của vi sinh vật. "Nước sữa" là phần thu được sau khi loại bỏ thành phần béo của sữa và casein từ sữa. Ví dụ, nước sữa có thể thu được dưới dạng dịch nuôi cấy nổi khi thành phần sữa được lên men bằng vi sinh vật, và tốt hơn là chứa đường như lactoza và galactoza, axit amin, axit lactic, protein, và các thành phần tương tự. Ngoài ra, nước sữa tốt hơn là dịch nuôi cấy nổi thu được khi thành phần sữa được nuôi cấy cụ thể bằng vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium. Trong ngữ cảnh này, ví dụ về vi

khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium có thể bao gồm vi khuẩn *Lactobacillus* như *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*, và *Lactobacillus helveticus*; vi khuẩn *Streptococcus* như *Streptococcus thermophilus*; vi khuẩn *Lactococcus* như *Lactococcus lactis* loài phụ *lactis* và *Lactococcus lactis* loài phụ *cremoris*; vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*; và vi khuẩn *Bifidobacterium* như *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, và *Bifidobacterium longum*.

Hàm lượng thành phần sữa trong môi trường nuôi cấy tốt hơn là, nhưng không chỉ giới hạn ở, từ 1 đến 50% khối lượng (sau đây đơn giản gọi là "%") và tốt Ngoài ra là từ 2 đến 10% tính theo hàm lượng rắn. Hàm lượng axit benzoic và/hoặc muối của nó trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa tốt hơn là từ 0,001 đến 0,1% và tốt Ngoài ra là từ 0,01 đến 0,05% về mặt hiệu suất tạo etyl benzoat bởi vi sinh vật và tiềm năng sinh trưởng của vi sinh vật. Hàm lượng glucoza tốt hơn là từ 0,1 đến 10% và tốt Ngoài ra là từ 1 đến 5% về mặt tiềm năng sinh trưởng của vi sinh vật.

Nhiệt độ để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* tốt hơn là, nhưng không giới hạn cụ thể ở, từ 15 đến 30°C và tốt Ngoài ra là từ 20 đến 30°C về mặt hương thơm của sản phẩm nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy tốt hơn là 8 giờ hoặc lâu hơn, và tốt Ngoài ra là từ 24 đến 32 giờ. Khi axit benzoic và/hoặc muối của nó được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy tốt hơn là từ 24 đến 48 giờ, và tốt Ngoài ra là từ 32 đến 48 giờ. Ví dụ về phương pháp nuôi cấy bao gồm nuôi cấy lắc, nuôi cấy tĩnh, nuôi cấy có lắc, và nuôi cấy ở độ pH trung tính.

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế chứa 1,0 ppm etyl benzoat hoặc nhiều hơn và có hương trái cây phức hợp hơn và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học chứa etyl benzoat. Hàm lượng etyl benzoat tốt hơn là từ 1,0 đến 50 ppm, và tốt Ngoài ra là từ 1,0 đến 30 ppm.

Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể chứa các thành phần thơm khác ngoài etyl benzoat. Ví dụ về các thành phần thơm khác bao gồm thành phần thơm như rượu isoamyllic.

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế chứa lượng lớn etyl benzoat và có hương trái cây dễ chịu, phức hợp hơn, và tươi mát hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học chứa etyl benzoat, và do đó, có thể dùng trong chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc

đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự. Sản phẩm nuôi cấy có thể có triển vọng sử dụng trong mỹ phẩm, vì trong công nghiệp thuộc lĩnh vực mỹ phẩm không có nhiều hương sinh học và nhu cầu về hương tự nhiên cao hơn so với hương tổng hợp.

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có thể được bổ sung vào chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự ở dạng như vậy, nhưng tốt hơn nếu sản phẩm nuôi cấy được bổ sung vào sau khi lọc. Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy có thể được cô đặc bằng phương pháp đông khô, chưng cất, hoặc phương pháp tương tự, và thể đặc thu được có thể được bổ sung vào chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự.

Ví dụ về mỹ phẩm bao gồm các mỹ phẩm thơm như nước hoa, nước hoa eau de cologne, và nước hoa eau de toilette; sản phẩm chăm sóc da cơ bản như nước cân bằng da (toner), sữa dưỡng (milky lotion), kem dưỡng (lotion), kem, mặt nạ, và huyết thanh dưỡng da (serum); sản phẩm chăm sóc tóc như dầu gội đầu và dầu xả; mỹ phẩm dùng để tắm như sản phẩm hỗ trợ dùng để tắm; sản phẩm trang điểm như mỹ phẩm nền; và mỹ phẩm đặc biệt như mỹ phẩm chống nắng. Ví dụ về thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm nhiều loại đồ uống giải khát khác nhau, rượu mùi có ga, bia, rượu sake tinh chế, bánh kẹo, nước đá, kem, và các sản phẩm sữa như sữa lên men. Ví dụ về dược phẩm bao gồm dược phẩm dùng ngoài da như kem, thuốc mỡ, và gel. Hàm lượng sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế trong mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, và dược phẩm như vậy tốt hơn là từ 0,01 đến 10% và tốt Ngoài ra là từ 0,1 đến 1% tính theo hàm lượng rắn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ.

Ví dụ 1

(1) Các chủng và giống trước giai đoạn tiền nuôi cấy

(i) Các chủng được sử dụng

Wickerhamomyces pijperi YIT8095 (NBRC1290), *Wickerhamomyces pijperi* YIT12779 (NBRC1887)

Ví dụ so sánh: *Kluyveromyces marxianus* YIT12612 (NBRC0260)

(ii) Giai đoạn trước giai đoạn tiền nuôi cấy

Giống trước giai đoạn tiền nuôi cấy: 20 μ l chủng bảo quản lạnh đông trong glyxerol 20% được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy cho nấm men và nấm mốc (YM) (1% glucoza, 0,5% pepton, 0,3% chất chiết nấm men, và 0,3% chất chiết mạch nha) và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(2) Phân tích các thành phần thơm do vi khuẩn tạo ra

(i) Giai đoạn tiền nuôi cấy

Giống tiền nuôi cấy: 20 μ l dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn trước giai đoạn tiền nuôi cấy được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

Như môi trường nuôi cấy chứa nước sữa đã mô tả trên đây, dịch nuôi cấy nổi chứa sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy *Streptococcus thermophilus* YIT2084 (FERM BP-10879) trong 3% môi trường nuôi cấy chứa bột sữa đã tách béo được sử dụng. Kết quả phân tích dịch nuôi cấy nổi này cho thấy rằng dịch nuôi cấy nổi chứa lactoza với lượng 1,1%, galactoza với lượng 0,4%, và axit lactic với lượng 0,4%, và có độ pH = 4,0.

(ii) Giai đoạn nuôi cấy

Giống nuôi cấy: 50 μ l dung dịch tiền nuôi cấy được cấy vào 5 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(iii) Phân tích các thành phần thơm

Sau khi hoàn thành việc ủ, thu mẫu và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 5 phút và 2 ml dịch nuôi cấy nổi được thu gom vào trong lọ 20 ml. Sau đó, thành phần thơm trong sản phẩm nuôi cấy được xác định bằng phương pháp đo phổ khối sắc ký khí Headspace (HS-GC-MS) (bảng 1 và 2). Ngoài ra, thành phần thơm đã xác định được định lượng bằng bộ dò ion hóa bằng ngọn lửa (Flame Ionization Detector - FID) HS-GC (bảng 3 và 4). Kết quả được thể hiện trong bảng 5. Ngoài ra, việc phân tích cảm quan về mùi của dung dịch nuôi cấy được tiến hành bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn được mô tả dưới đây. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Tiêu chuẩn đánh giá để phân tích cảm quan

5: Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện rõ rệt.

- 4: Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện.
 3: Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện nhẹ nhàng.
 2: Hương trái cây phức hợp và tươi mát khó phát hiện.
 1: Hương trái cây phức hợp và tươi mát không được phát hiện.

Bảng 1. Điều kiện HS

Thiết bị	MPS2-xt
Cỡ xi lanh	2,5 ml
Nhiệt độ máy khuấy	50°C
Tốc độ máy khuấy	250 vòng/phút
Thời gian cân bằng lọ	15 phút
Nhiệt độ xi lanh	100°C
Thể tích bơm	1000 μ L
Tốc độ bơm	200 μ L/giây

Bảng 2. Điều kiện GC-MS

Hệ thống	MS700D (JEOL)
Cột	InertCap Pure WAX 30m $\times$ đường kính trong 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m (GL Sciences)
Nhiệt độ lò	40°C-250°C (10°C/phút)
Khí mang	He
Tốc độ dòng	0,7 ml/phút
Nhiệt độ bơm	250°C
Tỷ lệ phân chia	Không phân chia
Độ phân giải MS	1000
Dòng điện ion hóa	300 μ A
Điện thế ion hóa	70 eV
Nhiệt độ buồng	250°C
Thể tích bơm	1 μ L

Bảng 3. Điều kiện HS

Thiết bị	Agilent 7697A
Kích cỡ vòng (ml)	5
Nhiệt độ lò (°C)	50

Nhiệt độ vòng (°C)	110
Nhiệt độ đường truyền (°C)	115
Cân bằng lọ (phút)	15
Thời gian bơm (phút)	1

Bảng 4. Điều kiện GC

Hệ thống	Agilent 7890B
Cột	InertCap Pure WAX 30 m × đường kính trong 0,25 mm x 0,25 µm (GL Sciences)
Nhiệt độ lò	40°C (5 phút) - 10°C/phút - 250°C (3 phút)
Khí mang	He
Tốc độ dòng	3 ml/phút
Nhiệt độ bơm	250°C
Tỷ lệ phân chia	20:1
Tốc độ dòng phân chia	60 ml/phút
Cân bằng lọ (phút)	5
Thời gian bơm (phút)	1

Bảng 5

Hợp chất (ppm)	NBRC1290	NBRC1887	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC0260
Rượu			
Rượu isoamylic	10,07	10,79	29,07
Etyl este			
Etyl benzoat	1,14	1,24	0,00
Đánh giá bằng phương pháp phân tích cảm quan	5	5	1

Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện rõ rệt trong các dung dịch nuôi cấy chủng NBRC1290 và chủng NBRC1887. Kết quả phân tích các thành phần thơm và so sánh hàm lượng các hợp chất chứng tỏ các dung dịch nuôi cấy có hàm lượng etyl benzoat cao theo cách đặc trưng. Để so sánh với các dung dịch nuôi cấy này, thành phần thơm của các dung dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy các loài nấm men

khác nhau (chủng *Kluyveromyces marxianus* NBRC0260) trong môi trường nuôi cấy chứa nước sữa được phân tích và đánh giá. Kết quả thể hiện rằng dung dịch nuôi cấy chủng NBRC0260 có hương thơm như hoa hồng mạnh nhưng hầu như không có hương trái cây bất kỳ, và không chứa etyl benzoat.

Các dung dịch nuôi cấy chủng NBRC1290 và chủng NBRC1887 và sản phẩm tổng hợp hóa học chỉ chứa etyl benzoat với lượng bằng lượng trong các dung dịch nuôi cấy được đưa vào phân tích cảm quan. Hương phức hợp mà sản phẩm tổng hợp hóa học không tạo ra được được phát hiện trong các dung dịch nuôi cấy chủng NBRC1290 và chủng NBRC1887. Do đó, các dung dịch nuôi cấy có hương thơm dễ chịu hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học.

(3) Sự khác biệt về hiệu suất của các thành phần thơm từ vi khuẩn phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng chủng NBRC1290 và chủng NBRC1887.

(i) Giai đoạn tiền nuôi cấy

Giống tiền nuôi cấy: Các phần phân ước 20 µl của dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn trước giai đoạn tiền nuôi cấy được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza, 2 ml môi trường nuôi cấy YPD (1% chất chiết nấm men, 2% pepton, và 2% glucoza), và 2 ml môi trường nuôi cấy YM (1% glucoza, 0,5% pepton, 0,3% chất chiết nấm men, và 0,3% chất chiết mạch nha) và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(ii) Giai đoạn nuôi cấy

Giống nuôi cấy: Các phần phân ước 5 ml của dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn tiền nuôi cấy được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza, 2 ml môi trường nuôi cấy PD, và 2 ml môi trường nuôi cấy YM, và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(iii) Phân tích hàm lượng thành phần thơm

Sau khi hoàn thành việc ủ, hàm lượng thành phần thơm trong sản phẩm nuôi cấy được phân tích bằng HS-GC-FID (bảng 3 và 4). Kết quả được thể hiện trong bảng 6. Việc phân tích cảm quan về mùi của sản phẩm nuôi cấy cũng được tiến hành bằng cách

sử dụng cùng các tiêu chuẩn như được mô tả trong ví dụ 1 (2). Kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6

Hợp chất (ppm)	NBRC1290			NBRC1887		
	Nước sữa	YPD	YM	Nước sữa	YPD	YM
Rượu						
Rượu isoamyllic	17,07	242,14	70,07	7,53	235,7	98,31
Etyl este						
Etyl benzoat	2,69	0,10	0,09	2,78	0,00	0,11
Đánh giá bằng phương pháp phân tích cảm quan	5	2	2	5	1	2

Khi chủng NBRC1290 và chủng NBRC1887 được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy chứa nước sữa, hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện rõ rệt trong các dung dịch nuôi cấy thu được. Các dung dịch nuôi cấy chứa lượng lớn etyl benzoat. Trái lại, khi các chủng nêu trên đây được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy YM và môi trường nuôi cấy YPD, các dung dịch nuôi cấy thu được, trong một số trường hợp, chứa etyl benzoat, nhưng với hàm lượng thấp và hương trái cây phức hợp và tươi mát hầu như không được phát hiện.

(4) Sự khác biệt về hiệu suất của thành phần thơm từ vi khuẩn phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng chủng NBRC1887.

(i) Giai đoạn tiền nuôi cấy

Giống tiền nuôi cấy: 20 µl dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn trước giai đoạn tiền nuôi cấy được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(ii) Giai đoạn nuôi cấy

Giống nuôi cấy: Các phần phân ước 1 ml của dung dịch tiền nuôi cấy được cấy vào 100 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 25°C, và 30°C. Các mẫu được thu thập sau khi ủ 0, 24, 32, 48, và 56 giờ.

(iii) Phân tích hàm lượng etyl benzoat

Hàm lượng etyl benzoat trong các sản phẩm nuôi cấy được phân tích bằng HS-GC-FID (bảng 3 và 4). Kết quả được thể hiện trong bảng 7. Ngoài ra, việc phân tích cảm quan về mùi của các sản phẩm nuôi cấy được tiến hành bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn được mô tả dưới đây. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

(Tiêu chuẩn đánh giá để phân tích cảm quan)

- a: Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện rõ rệt.
- b: Hương trái cây phức hợp và tươi mát được phát hiện.
- c: Hương trái cây phức hợp và tươi mát nhẹ được phát hiện nhưng độ phức hợp thấp.
- d: Mùi của các thành phần thơm khác mạnh. Đặc tính về mùi thay đổi và mùi như rượu sake được phát hiện.
- e: Hương trái cây phức hợp và tươi mát không được phát hiện.

Bảng 7

Etyl benzoat (ppm)/ Đánh giá bằng phương pháp phân tích cảm quan	0 giờ	24 giờ	32 giờ	48 giờ	54 giờ
15°C	0/e	0,73/c	2,48/c	2,24/c	2,18/c
20°C	0/e	3,04/a	2,54/b	2,06/d	1,90/d
25°C	0/e	2,48/b	1,89/b	1,65/d	1,67/d
30°C	0/e	2,23/b	1,72/b	1,26/d	1,51/d

Đối với thử nghiệm ủ ở nhiệt độ 15°C, etyl benzoat được tạo ra bởi sự lên men của vi khuẩn. Tuy nhiên, mùi của các thành phần thơm khác là yếu, và do đó độ phức hợp về mùi của sản phẩm nuôi cấy là thấp. Trái lại, sản phẩm nuôi cấy thu được từ thử nghiệm ủ ở nhiệt độ từ 20 đến 30°C có hương trái cây phức hợp và tươi mát, tức là, sản phẩm nuôi cấy có mùi dễ chịu. Trong trường hợp thời gian nuôi cấy là 48 giờ hoặc lâu hơn, hiệu suất của các thành phần thơm không phải etyl benzoat tăng do sự lên men của vi khuẩn. Do đó, mùi của các thành phần thơm khác trở nên mạnh hơn đến mức đặc trưng về mùi bị thay đổi và mùi như rượu sake được phát hiện. Do đó, tốt hơn nếu thời gian nuôi cấy là từ 24 đến 32 giờ.

(5) Sự khác biệt về hàm lượng etyl benzoat thu được từ việc bổ sung axit benzoic hoặc muối của nó vào môi trường nuôi cấy

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng chủng NBRC1887.

(i) Giai đoạn tiền nuôi cấy

Giống tiền nuôi cấy: 20 μ l dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn trước giai đoạn tiền nuôi cấy được cấy vào 2 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C.

(ii) Giai đoạn nuôi cấy

Giống nuôi cấy: natri benzoat được bổ sung vào 100 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza đến nồng độ cuối là 0,01%. Theo cách tương tự, mỗi chất trong số axit benzoic, phenylalanin, và para-hydroxymethylbenzen được bổ sung vào 100 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza để thu được môi trường nuôi cấy chứa 0,01% axit benzoic, môi trường nuôi cấy chứa 0,01%, 0,05%, hoặc 0,1% phenylalanin, và môi trường nuôi cấy chứa 0,01% hoặc 0,05% para-hydroxymethylbenzen. Ngoài ra, 100 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza mà không chứa chất phụ gia được chuẩn bị làm đối chứng. Các phần phân ước một mililit của dung dịch tiền nuôi cấy được cấy vào từng môi trường nuôi cấy và ủ có lắc ở 160 vòng/phút ở 30°C. Các mẫu được thu thập sau khi ủ 0, 24, 32, và 48 giờ.

(iii) Phân tích hàm lượng etyl benzoat

Hàm lượng etyl benzoat trong các sản phẩm nuôi cấy được phân tích bằng HS-GC-FID (bảng 3 và 4). Kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8. Hàm lượng etyl benzoat trong từng dung dịch nuôi cấy (ppm)

	Đối chứng	0,01% Natri benzoat	0,01% Axit benzoic	0,01% Phenyl- alanin	0,05 % Phenyl- alanin	0,1% Phenyl- alanin	0,01% Para- hydroxy- methyl- benzen	0,05% Para- hydroxy- methyl- benzen
0 giờ	0	0	0	0	0	0	0	0
24 giờ	2,44	3,30	2,41	2,43	2,38	2,66	0,71	0,07
32 giờ	3,54	12,59	15,31	3,37	3,39	3,65	2,17	0,34
48 giờ	2,89	27,67	23,53	2,48	2,58	2,28	2,78	2,12

Hàm lượng etyl benzoat trong các sản phẩm nuôi cấy tăng đáng kể khi axit benzoic hoặc natri benzoat được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và thời gian nuôi cấy là từ 32 đến 48 giờ. Hàm lượng etyl benzoat trong các sản phẩm nuôi cấy hầu như không tăng khi các chất khác được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Ví dụ bào chế 1

Về các chế phẩm được thể hiện trong bảng 9, các thành phần (1) đến (4) được bổ sung vào hỗn hợp chứa (5) và (6). Hỗn hợp này được khuấy kỹ để tạo ra nước cân bằng da. Nước cân bằng da này có hương trái cây phức hợp và tươi mát. Trong ví dụ này, dung dịch nuôi cấy được sử dụng sau khi lọc, trong đó dung dịch nuôi cấy thu được bằng cách ủ 1 ml dung dịch tiền nuôi cấy thu được từ giai đoạn tiền nuôi cấy trong ví dụ 1 (4) vào 100 ml môi trường nuôi cấy chứa nước sữa có bổ sung 1% glucoza và ủ môi trường nuôi cấy này có lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ ở 20°C.

Bảng 9

	Nguyên liệu thô	Lượng được dùng (%)
(1)	Etanol	5,0
(2)	1,3-Butylen glycol	2,0
(3)	Dầu thầu dầu hydro hóa bằng polyoxyetylen	0,05
(4)	Metyl parahydroxybenzoat	0,1
(5)	Dung dịch nuôi cấy	10,0
(6)	Nước cất	Lượng cân bằng đến 100

Ví dụ bào chế 2

Về chế phẩm được thể hiện trong bảng 10, các thành phần từ (7) đến (9) được bổ sung vào thành phần (10), và hỗn hợp này được đun nóng và sau đó nhũ hóa bằng cách bổ sung các thành phần từ (1) đến (6) vào đó ở 80°C. Hỗn hợp này được để cho mát đến nhiệt độ trong phòng để tạo ra sữa dưỡng. Sữa dưỡng này có hương trái cây phức hợp và tươi mát. Dung dịch nuôi cấy được sử dụng là cùng loại dung dịch nuôi cấy trong ví dụ bào chế 1.

Bảng 10

	Nguyên liệu thô	Lượng (%)
(1)	Axit stearic	2,0
(2)	Parafin lỏng	5,0
(3)	Squalan	2,0
(4)	Sorbitan monostearat	0,05
(5)	Polyoxyetylen (20) sorbitan monostearat	2,0
(6)	Butyl parahydroxybenzoat	0,05
(7)	Glyxerin	2,0
(8)	Metyl parahydroxybenzoat	0,1
(9)	Dung dịch nuôi cấy	3,0
(10)	Nước cất	Lượng cân bằng đến 100%

Ví dụ bào chế 3

Về chế phẩm được thể hiện trong bảng 11, các thành phần từ (9) đến (11) được bổ sung vào thành phần (12), và hỗn hợp này được đun nóng và sau đó nhũ hóa bằng cách bổ sung các thành phần từ (1) đến (8) vào đó ở 80°C. Hỗn hợp này được để cho mát đến nhiệt độ trong phòng để tạo ra kem. Kem này có hương trái cây phức hợp và tươi mát. Dung dịch nuôi cấy được sử dụng là cùng loại dung dịch nuôi cấy trong ví dụ bào chế 1.

Bảng 11

	Nguyên liệu thô	Lượng (%)
(1)	Parafin lỏng	23,0
(2)	Vazolin	7,0
(3)	Xetanol	1,0
(4)	Axit stearic	2,0
(5)	Sáp ong	2,0
(6)	Sorbitan monostearat	3,5
(7)	Polyoxyetylen (20) sorbitan monostearat	2,5

(8)	Butyl parahydroxybenzoat	0,05
(9)	1,3-Butylen glycol	1,0
(10)	Metyl parahydroxybenzoat	0,1
(11)	Dung dịch nuôi cấy	3,0
(12)	Nước cất	Lượng cân bằng đến 100

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* trong môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Wickerhamomyces* là *Wickerhamomyces pijperi* NBRC1290 và/hoặc *Wickerhamomyces pijperi* NBRC1887.
2. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa là môi trường nuôi cấy chứa nước sữa.
3. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó môi trường nuôi cấy chứa thành phần sữa còn chứa thêm axit benzoic và/hoặc muối của nó.
4. Chế phẩm tạo hương chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
5. Mỹ phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
6. Thực phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
7. Đồ uống chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
8. Dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
9. Phương pháp đưa hương thơm vào mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc dược phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 vào mỹ phẩm, thực phẩm, đồ uống, hoặc dược phẩm.