



(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)



1-0053204

(51)^{2019.01} C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2020-00434

(22) 26/06/2017

(86) PCT/JP2017/023444 26/06/2017

(87) WO 2019/003283 03/01/2019

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/05/2020 386A

(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 VI SINH VẬT, SẢN PHẨM CHUNG CẤT, CHẾ PHẨM TẠO HƯƠNG, MỸ PHẨM, THỰC PHẨM, ĐỒ UỐNG, DƯỢC PHẨM CHỨA SẢN PHẨM NUÔI CÂY HOẶC SẢN PHẨM CHUNG CẤT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM NUÔI CÂY

(21) 1-2020-00434

(57) Sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và thích hợp để đem lại hương thơm hoa hồng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự.

Sản phẩm nuôi cấy này thu được bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus*, và bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng phenylethyl axetat.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm chưng cất, chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm, đồ uống, dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy hoặc sản phẩm chưng cất và phương pháp sản xuất sản phẩm nuôi cấy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm nuôi cấy vi sinh vật có hương thơm hoa hồng và việc sử dụng sản phẩm nuôi cấy này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

2-Phenyletanol (2PE) và phenyletyl axetat (PEAc) được biết là thành phần hương thơm hoa hồng điển hình. Các hợp chất như vậy thường được tổng hợp hóa học và được sử dụng trong hương liệu của các mặt hàng khác nhau bao gồm cả các mỹ phẩm.

Tuy nhiên, vì hương thơm của các chất tổng hợp hóa học này là đơn điệu và gây gây khó chịu mạnh mẽ, nên một hương thơm dịu nhẹ và tự nhiên hơn đã được yêu cầu. Hơn nữa, có một mối lo ngại rằng dung môi được sử dụng trong quá trình tổng hợp có thể vẫn còn.

Ngoài ra, biết rằng một số loại nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* tạo ra thành phần hương liệu, và các sản phẩm nuôi cấy này đã được sử dụng làm sản phẩm nuôi cấy có hương thơm cho thực phẩm, đồ uống hoặc các loại tương tự (tài liệu sáng chế 1 đến 3).

Kluyveromyces marxianus được biết đến là nấm men sản xuất 2-phenyletanol, và đã được báo cáo rằng 2-phenyletanol có thể được sản xuất một cách hiệu quả bằng cách nuôi cấy nấm men trong môi trường được bổ sung L-phenylalanin, đây là một loại tiền chất (tài liệu phi sáng chế 1). Tuy nhiên, khi việc nuôi cấy được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nấm men thông thường, sẽ khó sử dụng sản phẩm nuôi cấy này cho các mỹ phẩm hoặc các sản phẩm tương tự vì mùi mạnh của chiết xuất nấm men, pepton hoặc các mùi tương tự có trong môi trường, và cần phải thực hiện việc xử lý chưng cất hoặc tách và tinh chế 2-phenyletanol.

Trong khi đó, đã được báo cáo rằng đồ uống có cồn có thể được sản xuất bằng cách chưng cất chất lỏng lên men thu được bằng cách lên men whey phô mai với *Kluyveromyces marxianus* ATCC10022, và sản phẩm chưng cất chứa các thành phần dễ bay hơi như etyl axetat ngoài các rượu như rượu isoamyl, rượu isobutyl, 1-propanol, và rượu isopentyl (tài liệu phi sáng chế 2).

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-5-49465

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-2001-103959

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2012-55286

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: CE Fabre et al., *Biotechnol. Prog.* 14, 270-274 (1998)

Tài liệu phi sáng chế 2: G. Dragone et al., *Food Chemistry* 112, 929-935 (2009)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề cập đến việc cung cấp sản phẩm nuôi cấy vi sinh vật có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và thích hợp để đem lại hương thơm hoa hồng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các loại tương tự.

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng để phát triển chế phẩm có hương thơm hoa hồng dễ chịu, và phát hiện được rằng sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus* có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quyến rũ, thay vì mùi rượu, và là hữu ích để đem lại hương thơm cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm và các loại tương tự, do đó hoàn thành sáng chế.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các mục từ [1] đến [14] sau đây.

- [1] Sản phẩm nuôi cấy, thu được bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus*, và bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng phenyletyl axetat.
- [2] Sản phẩm nuôi cấy theo mục [1], trong đó quá trình lên men được thực hiện với sự có mặt của L-phenylalanin.
- [3] Sản phẩm nuôi cấy theo mục [1] hoặc [2], trong đó thành phần sữa là bột sữa gầy.
- [4] Sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic là dịch nổi nuôi cấy.
- [5] Sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó *Kluyveromyces marxianus* là *Kluyveromyces marxianus* YIT12612 (NBRC0260).
- [6] Sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó vi khuẩn axit lactic là *Streptococcus thermophilus* YIT2084 (FERM BP-10879).
- [7] Sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó quá trình lên men được thực hiện bằng cách bổ sung *Kluyveromyces marxianus* vào sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa, tiếp đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 15 đến 45°C trong 15 đến 54 giờ.
- [8] Sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó sản phẩm nuôi cấy là sản phẩm chưng cất đã được xử lý chưng cất.
- [9] Chế phẩm tạo hương chứa sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].
- [10] Mỹ phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].
- [11] Thực phẩm hoặc đồ uống chứa sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].
- [12] Dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].

[13] Phương pháp đưa hương thơm hoa hồng vào mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc dược phẩm, bao gồm bước bổ sung sản phẩm nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8] vào các sản phẩm này.

[14] Phương pháp sản xuất sản phẩm nuôi cấy bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng phenyletyl axetat, bao gồm bước lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sản phẩm nuôi cấy của sáng chế là sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus*, và bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng phenyletyl axetat.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thành phần sữa" có nghĩa là sữa tươi, sữa được xử lý nhiệt, bột sữa gầy, hoặc bột sữa nguyên kem của 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 whey. Trong số này, bột sữa gầy là được ưu tiên. "Whey" thu được bằng cách loại bỏ chất béo và casein khỏi các thành phần sữa.

Theo sáng chế, làm sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa, ví dụ, sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa nêu trên (môi trường chứa thành phần sữa) có thể được đề cập, và dịch nổi nuôi cấy của sản phẩm nuôi cấy có thể được đề cập một cách thích hợp. Việc lên men môi trường chứa thành phần sữa với vi sinh vật không chỉ ức chế các mùi có nguồn gốc từ các thành phần sữa và hầu như không ảnh hưởng đến hương thơm hoa hồng dịu nhẹ, mà còn làm giảm độ pH, do đó kết tủa các thành phần không hòa tan có nguồn gốc từ các thành phần sữa và làm tăng hiệu quả công việc khi thu được dịch nổi nuôi cấy.

Môi trường chứa thành phần sữa có thể chứa thêm các thành phần khác như đường, vitamin, các sản phẩm thoái biến của protein, axit amin, khoáng chất, muối, chất hoạt động bề mặt, axit béo và kim loại. Các thành phần khác không bị giới hạn cụ thể, nhưng

các loại đường như glucoza, galactoza, lactoza và fructoza là được ưu tiên. Glucoza được đặc biệt ưu tiên làm đường theo quan điểm sử dụng nó bởi vi sinh vật. Chiết xuất nấm men, pepton và các loại tương tự tốt hơn là không được sử dụng vì chúng có thể ảnh hưởng đến hương thơm của sản phẩm nuôi cấy của sáng chế.

Hàm lượng của thành phần sữa trong môi trường không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là từ 1 đến 50% theo khối lượng (sau đây, khi được gọi đơn giản là "%", thuật ngữ này chỉ "%" theo khối lượng") và tốt hơn nữa là từ 2 đến 10 % tính theo hàm lượng chất rắn. Hàm lượng glucoza tốt hơn là 0,1 đến 10%, và tốt hơn nữa là 1 đến 5% theo quan điểm về khả năng tăng trưởng của vi sinh vật.

Ở đây, các ví dụ về vi khuẩn axit lactic bao gồm vi khuẩn *Lactobacillus* như *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, và *Lactobacillus helveticus*; vi khuẩn *Streptococcus* như *Streptococcus thermophilus*; vi khuẩn *Lactococcus* như *Lactococcus lactis subsp. lactis* và *Lactococcus lactis subsp. cremoris*; vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*; và vi khuẩn *Bifidobacterium* như *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, và *Bifidobacterium longum*. Trong số đó, vi khuẩn *Streptococcus* là được ưu tiên, *Streptococcus thermophilus* là được ưu tiên hơn, và *Streptococcus thermophilus* YIT2084 (FERM BP-10879) là được ưu tiên hơn nữa.

Các điều kiện để lên men môi trường chứa thành phần sữa nêu trên với vi khuẩn axit lactic không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ, vi khuẩn axit lactic có thể được cấy vào môi trường với lượng 0,01 đến 10%, tốt hơn là 0,1 đến 5%, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở 20 đến 45°C, tốt hơn là ở 37 đến 42°C, trong 1 đến 48 giờ, tốt hơn là trong 4 đến 30 giờ. Làm các điều kiện nuôi cấy khác tại thời điểm này, việc để yên, khuấy, lắc, sục khí, và tương tự có thể được đề cập, và phương pháp thích hợp để nuôi cấy có thể được lựa chọn một cách thích hợp từ các điều kiện này.

Do đó, sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa thu được có thể được sử dụng như vậy, nhưng các phương pháp xử lý tách và tinh chế đã biết như lọc, thẩm tách, kết tủa, và ly tâm cũng có thể được thực hiện.

Sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách lên men môi trường chứa bột sữa gầy với *Streptococcus thermophilus* YIT2084 và loại bỏ các tế bào vi khuẩn khỏi đó, và tốt hơn nữa là phần cắt có khối lượng phân tử là 20.000 hoặc nhỏ hơn thu được bằng cách xử lý dịch nổi nuôi cấy như siêu lọc, lọc gel hoặc thẩm tách. Hơn nữa, sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa tốt hơn là bao gồm đường như lactoza hoặc galactoza, axit amin, axit lactic, protein, hoặc các loại tương tự.

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế được điều chế bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa với *Kluyveromyces marxianus*.

Ở đây, *Kluyveromyces marxianus* không bị giới hạn cụ thể miễn là nó tạo ra phenyletyl axetat và rượu isoamyl, nhưng tốt hơn là *Kluyveromyces marxianus* YIT12612 (NBRC 0260).

Kluyveromyces marxianus được cấy với lượng tốt hơn là từ 0,1 đến 3,0%, tốt hơn nữa là từ 0,2 đến 1,0%, so với sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic.

Tại thời điểm này, L-phenylalanin (L-phe) tốt hơn là được bổ sung vào. Việc bổ sung L-phenylalanin có thể làm tăng lượng sản xuất phenyletyl axetat và 2-phenyletanol. Trong trường hợp này, L-phenylalanin được bổ sung vào sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic tốt hơn là với lượng 0,3 đến 10 g/L, tốt hơn nữa là với lượng 0,5 đến 5 g/L, và thậm chí tốt hơn nữa là với lượng 2 đến 4 g/L.

Việc nuôi cấy tốt hơn là được thực hiện trong các điều kiện mà không dẫn đến các điều kiện yếm khí, từ quan điểm làm tăng lượng sản xuất phenyletyl axetat và 2-phenyletanol.

Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là từ 15 đến 45°C, tốt hơn nữa là từ 20 đến 40°C, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 30 đến 35°C theo quan điểm về lượng sản xuất của phenyletyl axetat và rượu isoamyl và hương thơm. Thời gian nuôi cấy tốt hơn là từ 1 đến 72 giờ, tốt hơn nữa là từ 15 đến 54 giờ, thậm chí tốt hơn nữa là từ 15 đến 48 giờ, và đặc biệt tốt

hơn là từ 20 đến 30 giờ. Các điều kiện thích hợp hơn là ở 30 đến 35°C trong 20 đến 30 giờ.

Phương pháp nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và phương pháp nuôi cấy bất kỳ trong số phương pháp nuôi cấy khuấy, nuôi cấy tĩnh, nuôi cấy lắc, nuôi cấy ở độ pH trung hòa, và các phương pháp nuôi cấy tương tự có thể được sử dụng.

Do đó, sản phẩm nuôi cấy thu được có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ so với phenyletyl axetat được tổng hợp hóa học vì nó bao gồm các thành phần tạo hương khác nhau. Sản phẩm nuôi cấy có thể được sử dụng như vậy làm chế phẩm tạo hương để tạo hương thơm, nhưng ưu tiên sử dụng sản phẩm nuôi cấy sau khi loại bỏ các tế bào vi khuẩn bằng cách lọc, ly tâm, hoặc tương tự, và ưu tiên hơn là sử dụng sản phẩm chung cất thu được bằng cách chưng cất và cô đặc sản phẩm nuôi cấy bằng phương pháp chưng cất khí quyển, phương pháp chưng cất chân không hoặc phương pháp tương tự.

Sản phẩm nuôi cấy của sáng chế không chỉ bao gồm phenyletyl axetat và 2-phenyletanol, chúng là các thành phần hương hoa hồng, mà còn bao gồm rượu isoamyl và tương tự, nhưng từ quan điểm có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quyến rũ, tỷ lệ hàm lượng của phenyletyl axetat và rượu isoamyl trong sản phẩm nuôi cấy là 0,3 đến 5 phần khối lượng, tốt hơn là 0,3 đến 3 phần khối lượng, tốt hơn nữa là 0,3 đến 1,5 phần khối lượng rượu isoamyl so với 1 phần khối lượng phenyletyl axetat.

Phenyletyl axetat có hương thơm hoa hồng quyến rũ hơn so với 2-phenyletanol. Hương thơm hoa hồng của sản phẩm nuôi cấy của sáng chế dựa trên hương thơm hoa hồng của phenyletyl axetat và dịu nhẹ hơn hương thơm của chính phenyletyl axetat.

Ngoài ra, sản phẩm nuôi cấy (trước khi chưng cất) của sáng chế tốt hơn là bao gồm phenyletyl axetat với lượng từ 10 đến 100 ppm, 2-phenyletanol với lượng từ 100 đến 1500 ppm, và rượu isoamyl với lượng từ 5 đến 50 ppm, và tốt hơn là sản phẩm chưng cất bao gồm phenyletyl axetat với lượng từ 30 đến 500 ppm, 2-phenyl etanol với lượng từ 20 đến 1200 ppm, và rượu isoamyl với lượng từ 20 đến 300 ppm.

Vì sản phẩm nuôi cấy của sáng chế có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quyến rũ, nên nó có thể được sử dụng cho chế phẩm tạo hương, mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự. Trong lĩnh vực mỹ phẩm, có rất ít nước

hoa có nguồn gốc từ sinh vật và có thể ứng dụng trong công nghiệp, và nhu cầu về nước hoa tự nhiên cao hơn so với nước hoa tổng hợp, do đó sản phẩm nuôi cấy của sáng chế có thể được sử dụng thích hợp cho mỹ phẩm.

Trong tài liệu này, các ví dụ về mỹ phẩm bao gồm mỹ phẩm có hương thơm như nước hoa, nước hoa eau de cologne, hoặc nước hoa eau de toilette; mỹ phẩm cơ bản như nước cân bằng da, sữa dưỡng da, nước thơm, kem dưỡng da, mặt nạ, hoặc huyết thanh dưỡng da; sản phẩm chăm sóc tóc như dầu gội hoặc dầu xả; mỹ phẩm tắm như chất tắm; mỹ phẩm trang điểm như kem nền; và mỹ phẩm đặc biệt như kem chống nắng. Các ví dụ về thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm nhiều loại đồ uống giải khát, rượu sủi tăm, bia, rượu sake tinh chế, bánh kẹo, nước đá, kem, và sản phẩm sữa như sữa lên men. Các ví dụ về dược phẩm bao gồm chế phẩm dùng bên ngoài như kem bôi, thuốc mỡ, và gel.

Hàm lượng của sản phẩm nuôi cấy của sáng chế trong mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, và dược phẩm tốt hơn là 0,1 đến 50 ppm và tốt hơn nữa là 0,1 đến 10 ppm đối với phenylethyl axetat.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết bằng các ví dụ.

Ví dụ 1

(1) Điều chế sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic

Streptococcus thermophilus YIT2084 (FERM BP-10879) được cấy với lượng 1% vào môi trường chứa 3% bột sữa gầy và nuôi cấy tĩnh ở 40°C trong 24 giờ. Sản phẩm nuôi cấy thu được được ly tâm ở $8.000 \times g$ ở 4°C trong 15 phút. Dịch nổi thu được được siêu lọc bằng bộ lọc siêu lọc ly tâm (Centricut Mini V-20, do Kurabo Industries Ltd. sản xuất) có khối lượng phân tử giới hạn là 20.000 Da ở $3.000 \times g$ ở 4°C trong 1 giờ để thu được phần có khối lượng phân tử thấp (khối lượng phân tử không lớn hơn 20.000) của dịch nổi của sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic.

Kết quả của việc phân tích phần có khối lượng phân tử thấp cho thấy nó chứa 1,1% lactoza, 0,4% galactoza và 0,4% axit lactic, và có độ pH là 4,0.

(2) Điều chế sản phẩm nuôi cấy *Kluyveromyces marxianus*

(a) Chủng được sử dụng

Kluyveromyces marxianus YIT12612 (NBRC 0260).

(b) Tiền nuôi cấy sơ bộ

Hai mươi μ L YIT12612 được bảo quản lạnh trong 20% glycerol được cấy vào 2 mL môi trường nấm men và nấm mốc (YM) (1% glucoza, 0,5% pepton, 0,3% chiết xuất nấm men, và 0,3% chiết xuất mạch nha), và việc nuôi cấy lắc được thực hiện ở 160 vòng/phút ở 35°C trong 24 giờ.

(c) Nuôi cấy sơ bộ

Mười mL sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được điều chế ở bước (1) nêu trên được đặt vào bình Erlenmeyer 50 mL, sản phẩm nuôi cấy thu được từ giai đoạn tiền nuôi cấy sơ bộ ở bước (b) nêu trên được cấy vào đó với lượng 1%, và việc nuôi cấy lắc được thực hiện ở 160 vòng/phút ở 35°C trong 24 giờ.

(d) Nuôi cấy

Dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn nuôi cấy sơ bộ ở bước (c) nêu trên được cấy với lượng 0,3% vào sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được điều chế ở bước (1) nêu trên, và việc nuôi cấy lắc được thực hiện ở 200 vòng/phút ở 35°C trong 48 giờ. Một cách riêng biệt, L-phenylalanin được bổ sung vào sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được điều chế ở bước (1) nêu trên với lượng 3 g/L, tiếp đó lọc vô trùng, và 100 mL sản phẩm thu được được bổ sung vào thiết bị lên men bình mini 8 ống dẫn đã được hấp khử trùng (Bio Jr. 8), sau đó, dung dịch nuôi cấy thu được từ giai đoạn nuôi cấy sơ bộ ở bước (c) nêu trên được cấy vào đó với lượng 0,3%, và việc nuôi cấy lắc được thực hiện ở 200 vòng/phút ở 35°C trong 24 giờ hoặc 48 giờ.

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, các thao tác sau được thực hiện để điều chế các mẫu (A và B) để phân tích các thành phần hương thơm.

Mẫu A: sản phẩm nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong 10 phút, nhờ đó thu được dịch nổi.

Mẫu B: sản phẩm nuôi cấy được chưng cất bằng thiết bị bay hơi trong các điều kiện mà sự giảm áp suất được bắt đầu ở nhiệt độ gia nhiệt là 40°C và nhiệt độ làm mát là 0°C và quá trình chưng cất được tiếp tục ở 50 đến 60 mbar cho đến khi khoảng 1/6 dung dịch nuôi cấy được thu hồi, nhờ đó thu được sản phẩm chưng cất.

(e) Phân tích thành phần hương thơm và đánh giá hương thơm

Hai mL mỗi mẫu A và B được điều chế ở bước (d) nêu trên được cho vào lọ 2 mL, và các thành phần hương thơm trong mẫu được định lượng bằng HS-GC-máy dò ion hóa ngọn lửa (FID) (Bảng 1 và 2).

Hơn nữa, đánh giá cảm quan về hương thơm của từng mẫu được thực hiện bởi người tham gia có chuyên môn. Các kết quả cũng được thể hiện trong Bảng 3.

[Bảng 1]

Các điều kiện của bộ lấy mẫu không gian hơi

Dụng cụ	Agilent 7697A
Kích thước 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 tiêm (phút)	1

[Bảng 2]

Các điều kiện sắc ký khí

Hệ	Agilent 7890B
Cột	InertCap Pure WAX 30 m × 0,25 mm i.d. × 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 cấy	250°C

Tỷ lệ phân chia	20:1
Tốc độ dòng phân chia	60 mL/phút
Cân bằng lọ (phút)	5
Thời gian tiêm (phút)	1

[Bảng 3]

	Không bổ sung L-Phe		Bổ sung L-Phe			
	Nuôi cấy trong 48 giờ		Nuôi cấy trong 24 giờ		Nuôi cấy trong 48 giờ	
	Sản phẩm ví dụ 1	Sản phẩm ví dụ 2	Sản phẩm ví dụ 3	Sản phẩm ví dụ 4	Sản phẩm ví dụ 5	Sản phẩm ví dụ 6
Hợp chất (ppm)	Mẫu A (Sản phẩm nuôi cấy)	Mẫu B (Sản phẩm chung cấy)	Mẫu A (Sản phẩm nuôi cấy)	Mẫu B (Sản phẩm chung cấy)	Mẫu A (Sản phẩm nuôi cấy)	Mẫu B (Sản phẩm chung cấy)
Phenyletyl axetat	12,03	48,62	19,02	63,16	64,67	320,64
2-Phenyletanol	143,21	30,77	219,12	72,44	582,05	305,25
Rượu isoamyl	28,08	161,82	11,42	79,14	26,61	141,46
Phenyletyl axetat : rượu isoamyl	1 : 2,3	1 : 3,3	1 : 0,6	1 : 1,3	1 : 0,4	1 : 0,4
Đánh giá cảm quan	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện nhưng mùi lên men được phát hiện.	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và hơi yếu được phát hiện nhưng mùi lên men được phát hiện một chút.	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và hơi yếu được phát hiện nhưng mùi lên men được phát hiện một chút.	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện và gần như không có mùi lên men được phát hiện	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và hơi yếu được phát hiện nhưng mùi lên men được phát hiện.	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện nhưng mùi lên men được phát hiện một chút.

Việc chưng cất làm tăng phenyletyl axetat và rượu isoamyl và làm giảm 2-phenyletanol, nhưng tỷ lệ phenyletyl axetat trên rượu isoamyl là khoảng 1 : 0,4 đến 3 trước và sau khi chưng cất. Mẫu A (sản phẩm nuôi cấy) và mẫu B (sản phẩm chưng cất) có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ, và mùi lên men ở mức mà mẫu có thể được sử dụng như vậy cho mỹ phẩm. Ngoài ra, xác nhận được rằng mùi lên men đã được ức chế nhiều hơn trong trường hợp nuôi cấy trong 24 giờ. Cũng xác nhận được rằng việc bổ sung phenylalanin làm tăng lượng sản xuất phenyletyl axetat.

Ví dụ 2

Đánh giá cảm quan về hương thơm của các mẫu được thực hiện bởi ba người tham gia có chuyên môn cho sản phẩm ví dụ 4 của ví dụ 1 và các sản phẩm tổng hợp của phenyletyl axetat và rượu isoamyl. Các kết quả cũng được thể hiện trong Bảng 4.

<Đánh giá>

5: Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện.

4: Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện nhưng hơi khó chịu hoặc hơi yếu khi so với "5".

3: Hương thơm hoa hồng được phát hiện nhưng khó chịu hoặc yếu khi so với "5".

2: Hương thơm hoa hồng được phát hiện nhưng rất khó chịu hoặc yếu khi so với "5".

1: Hương thơm hoa hồng không được phát hiện.

[Bảng 4]

	Sản phẩm ví dụ 4	Sản phẩm so sánh 1	Sản phẩm so sánh 2	Sản phẩm so sánh 3	Sản phẩm so sánh 4
Hợp chất (ppm)	Mẫu B (Sản phẩm chưng cất)	Sản phẩm tổng hợp	Sản phẩm tổng hợp	Sản phẩm tổng hợp	Sản phẩm tổng hợp
Phenyletyl axetat	63,16	63	63	63	63
Rượu isoamyl	79,14	-	79	6,3	630
Phenyletyl axetat : rượu isoamyl	1 : 1,3	-	1 : 1,3	1 : 0,1	1 : 10
Đánh giá	5	2,3	4	3	1,3
Nhận xét của người tham gia có chuyên môn	Hương thơm hoa hồng dịu nhẹ được phát hiện và gần như không có mùi lên men được phát hiện	Hương thơm hoa hồng được phát hiện nhưng gây khó chịu khi so với sản phẩm ví dụ 4.	Hương thơm hoa hồng được phát hiện nhưng sự dịu nhẹ của nó không kéo dài, dẫn đến hương thơm đậm khi so với sản phẩm ví dụ 4.	Hương thơm nói chung yếu khi so với sản phẩm ví dụ 4.	Mùi giống rượu sake được phát hiện rõ nét. Mùi này không được công nhận là hương thơm hoa hồng.

Phenyletyl axetat tổng hợp được thấy là có hương thơm hoa hồng gây khó chịu mạnh khi so với sản phẩm ví dụ 4. Khi tỷ lệ của phenyletyl axetat trên rượu isoamyl nằm ngoài khoảng 1: 0,3 đến 5, kết quả là hương thơm hoa hồng là yếu hoặc mùi rượu là mạnh. Hơn nữa, ngay cả khi phenyletyl axetat tổng hợp và rượu isoamyl tổng hợp được pha trộn theo tỷ lệ 1: 1,3, hương thơm thu được là gây khó chịu khi so với sản phẩm ví dụ 4, và do đó, xác nhận rằng các thành phần khác thu được từ quá trình lên men cũng góp phần vào hương thơm hoa hồng dịu nhẹ.

Ví dụ sản xuất 1

Nước cân bằng da được điều chế với các thành phần sau đây. Trong phương pháp điều chế, thành phần (5) và (6) được trộn lẫn, thành phần (1) đến (4) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy kỹ để thu được nước cân bằng da. Nước cân bằng da có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quỳnh rũ.

[Bảng 5]

	Nguyên liệu thô	Lượng được sử dụng (%)
(1)	Etanol	5,0
(2)	1,3-Butylen glycol	2,0
(3)	Dầu thầu dầu được hydro hóa bằng polyoxyetylen	0,05
(4)	Metyl parahydroxybenzoat	0,1
(5)	Sản phẩm nuôi cấy của sản phẩm ví dụ 3 hoặc sản phẩm chưng cất của sản phẩm ví dụ 4	10,0*
(6)	Nước cất	Cân bằng đến 100

* Sản phẩm nuôi cấy chứa 19,02 ppm phenyletyl axetat và, do đó, mỹ phẩm này chứa 1,9 ppm phenyletyl axetat; và sản phẩm chưng cất chứa 63,16 ppm phenyletyl axetat, và do đó, mỹ phẩm này chứa 6,3 ppm phenyletyl axetat.

Ví dụ sản xuất 2

Sữa dưỡng da được điều chế với các thành phần sau đây. Trong phương pháp điều chế, thành phần (7) đến (8) được bổ sung vào thành phần (10), hỗn hợp này được gia

nhiệt và sau đó được nhũ hóa bằng cách bổ sung thành phần (1) đến (6) ở 80°C, hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, và sau đó thành phần (9) được bổ sung vào để thu được sữa dưỡng da. Sữa dưỡng da này có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quyến rũ.

[Bảng 6]

	Nguyên liệu thô	Lượng được sử dụng (%)
(1)	Axit stearic	2,0
(2)	Paraffin 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)	Sản phẩm nuôi cấy của sản phẩm ví dụ 3 hoặc sản phẩm chung cất của sản phẩm ví dụ 4	3,0*
(10)	Nước cất	Cân bằng đến 100%

* Sản phẩm nuôi cấy chứa 19,02 ppm phenyletyl axetat, và do đó, mỹ phẩm này chứa 0,57 ppm phenyletyl axetat; và sản phẩm chung cất chứa 63,16 ppm phenyletyl axetat, và do đó, mỹ phẩm này chứa 1,9 ppm phenyletyl axetat.

Ví dụ sản xuất 3

Kem dưỡng da được điều chế với các thành phần sau đây. Trong phương pháp điều chế, thành phần (9) đến (10) được bổ sung vào thành phần (12), hỗn hợp được gia nhiệt và sau đó được nhũ hóa bằng cách bổ sung thành phần (1) đến (8) vào ở 80°C, hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, và sau đó thành phần (11) được bổ sung vào để thu được kem dưỡng da. Kem dưỡng da này có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và quyến rũ.

[Bảng 7]

	Nguyên liệu thô	Lượng được sử dụng (%)
(1)	Paraffin lỏng	23,0
(2)	Vazolin vàng	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)	Sản phẩm nuôi cấy của sản phẩm ví dụ 3 hoặc sản phẩm chưng cất của sản phẩm ví dụ 4	3,0*
(12)	Nước cất	Cân bằng đến 100

* Sản phẩm nuôi cấy chứa 19,02 ppm phenyletyl axetat, và do đó, mỹ phẩm này chứa 0,57 ppm phenyletyl axetat; và sản phẩm chưng cất chứa 63,16 ppm phenyletyl axetat, và do đó, mỹ phẩm này chứa 1,9 ppm phenyletyl axetat.

Hiệu quả của sáng chế

Sản phẩm nuôi cấy theo sáng chế có hương thơm hoa hồng dịu nhẹ hơn so với sản phẩm tổng hợp hóa học và là hữu ích làm chế phẩm tạo hương để tạo ra hương thơm hoa hồng dịu nhẹ và có chất lượng cao cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm nuôi cấy thu được bằng cách lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic với *Kluyveromyces marxianus* với sự có mặt của L-phenylalanin,

trong đó sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa,

trong đó rượu isoamyl có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1,5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng của phenyletyl axetat, và

trong đó sản phẩm nuôi cấy này bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 50 ppm và phenyletyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 ppm.

2. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1, trong đó thành phần sữa là bột sữa gầy.

3. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic là dịch nổi nuôi cấy.

4. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó *Kluyveromyces marxianus* là *Kluyveromyces marxianus* YIT12612 (NBRC0260).

5. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn axit lactic là *Streptococcus thermophilus* YIT2084 (FERM BP-10879).

6. Sản phẩm nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó quá trình lên men được thực hiện bằng cách bổ sung *Kluyveromyces marxianus* vào sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic, tiếp đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 15 đến 45°C trong 15 đến 54 giờ.

7. Sản phẩm chưng cất thu được bằng cách cho sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 vào xử lý chưng cất,

trong đó sản phẩm chưng cất bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 300 ppm và phenyletyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 500 ppm.

8. Chế phẩm tạo hương chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc sản phẩm chưng cất theo điểm 7.

9. Mỹ phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc sản phẩm chưng cất theo điểm 7.

10. Thực phẩm hoặc đồ uống chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc sản phẩm chưng cất theo điểm 7.

11. Dược phẩm chứa sản phẩm nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc sản phẩm chưng cất theo điểm 7.

12. Phương pháp đưa hương thơm hoa hồng 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 6 hoặc sản phẩm chưng cất theo điểm 7 vào các sản phẩm này.

13. Phương pháp sản xuất sản phẩm nuôi cấy bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1,5 phần khối lượng so với 1 phần khối lượng của phenyletyl axetat, trong đó phương pháp này bao gồm bước lên men sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic với *Kluyveromyces marxianus* với sự có mặt của L-phenylalanin,

trong đó sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa thành phần sữa, và

trong đó sản phẩm nuôi cấy này bao gồm rượu isoamyl với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 50 ppm và phenyletyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 ppm.