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

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

(11) **1-0053737**

(51)[2024.01] **A23B 4/00**; A23L 27/00; C12N 1/20; A23B 4/12

(13) **B**

(21) 1-2020-03834

(22) 01/07/2020

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/01/2022 406A

(76) Bùi Ngọc Tân (VN)
Số 125 Ngô Kim Tài, Kênh Dương, Lê Chân, thành phố Hải Phòng

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM BẢO QUẢN VÀ TẠO MÀU SINH HỌC DÙNG CHO TƯƠNG ỚT, CHẾ PHẨM BẢO QUẢN VÀ TẠO MÀU SINH HỌC DÙNG CHO TƯƠNG ỚT VÀ TƯƠNG ỚT CHỨA NÓ

(21) 1-2020-03834

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học và quy trình sản xuất, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học này chứa các chế phẩm từ quả táo mèo (*Docynia indica*) và vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) được lên men bằng chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum.* Sáng chế cũng đề cập đến tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học này. Tương ớt theo sáng chế không sử dụng các chất bảo quản và chất tạo màu hóa học vì thế nâng cao chất lượng sản phẩm và đảm bảo an toàn tuyệt đối cho sức khỏe người tiêu dùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học, trong đó chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học này chứa các chế phẩm từ quả táo mèo (*Docynia indica*) và vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum.* Sáng chế cũng đề cập đến tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học này. Tương ớt theo sáng chế không sử dụng các chất bảo quản và chất tạo màu hóa học vì thế nâng cao chất lượng sản phẩm và đảm bảo an toàn tuyệt đối cho sức khỏe người tiêu dùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tương ớt là một trong số các loại gia vị phổ biến nhất không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước trên thế giới. Điều này cũng dễ hiểu bởi gia vị này là món chấm không thể thiếu đối với rất nhiều loại đồ ăn được chế biến tại nhà hoặc các quán ăn, nhà hàng. Tương ớt được bán trên thị trường hiện này chứa nhiều thành phần khác nhau tùy thuộc vào từng nhãn hiệu mà có thể bao gồm ớt, chất tạo độ sệt, chất tạo độ cay, chất bảo quản và chất tạo màu.

Chất bảo quản sử dụng trong tương ớt hiện nay là khá phổ biến. Có nhiều loại chất bảo quản mà có thể kể ra như axit benzoic và các muối natri benzoat, kali benzoat, canxi benzoat, các chất bảo quản này khi gặp vitamin C có trong thực phẩm có thể chuyển hóa thành hợp chất benzen mà vốn là một chất gây ung thư. Axit benzoic chính là phụ gia được sử dụng trong một nhãn hiệu tương ớt của Việt Nam được xuất khẩu sang thị trường Nhật Bản và là nguyên nhân khiến cho sản phẩm này bị thu hồi tại quốc gia này.

Chiếu theo liều lượng khuyến cáo của FAO và WHO, không nên tiêu thụ nhiều hơn 5mg/kg trọng lượng cơ thể mỗi ngày. Tức một người nặng 50kg không nên dùng quá 0,25g muối benzoat mỗi ngày.

Tuy nhiên, việc sử dụng các loại chất bảo quản thuộc nhóm axit benzoic và muối benzoat tốt nhất là cần phải hạn chế vì sự kết hợp của chúng với axit ascorbic sẽ tạo thành hóa chất độc hại cao làm ảnh hưởng đến các cơ quan máu và tổ chức thần kinh, làm tăng nguy cơ mắc bệnh bạch cầu cấp. Trong thực tế, đã có nhiều trường hợp ngộ độc, dị ứng, lên cơn hen, phát ban, huyết áp thấp, tiêu chảy, đau bụng do muối benzoat trong thực phẩm hoặc đồ uống sử dụng các muối này làm chất bảo quản.

Một hóa chất khác thường được sử dụng trong tương ớt cũng có khả năng gây ảnh hưởng tới sức khỏe của người tiêu dùng đó là chất tạo màu. Các chất tạo màu hóa học thường có độ bền màu rất cao, giá thành rẻ và chỉ cần 1 lượng rất nhỏ đã đủ cho màu như ý, đồng nhất, ổn định với biến động của môi trường.

Trong tương ớt, chất tạo màu thường được sử dụng là Sunset yellow FCF để tạo màu vàng, nó còn có tên gọi phổ biến là yellow 6. Một số nhãn hiệu tương ớt còn sử dụng thêm Ponceau 4R để tạo màu đỏ.

Mặc dù với hầu hết các chất tạo màu được phép sử dụng, trong liều lượng cho phép thì nhìn chung cơ thể sẽ tự đào thải nên không gây hại cho sức khỏe người dùng. Tuy nhiên, nên hạn chế tối đa sử dụng các chất tạo màu hóa học trong thực phẩm vì các chất tạo màu này đều được sản xuất từ nhựa than đá và có thể có tác động tiêu cực tới người dùng, ví dụ như chất tạo màu Ponceau 4R đang bị nghi ngờ có khả năng gây ung thư và chứng tăng động ở trẻ nhỏ và đã bị cấm ở một số nước.

Ngoài các màu phụ gia nêu trên, một số phụ gia phẩm màu tổng hợp phổ biến khác vẫn được dùng trong thực phẩm như màu vàng chanh tartrazine, màu đỏ: amaranth, carmoisine, red 3, red 2G, red AC, màu xanh: xanh nhạt patent blue V, xanh lơ blue 1 hay brilliant blue, xanh lam blue 2 hay indigotine, xanh lục sáng green S,v.v.. Tất cả các phụ gia màu tổng hợp đều độc hại với con người. Khi sử dụng quá liều lượng cho phép sẽ gây

dị ứng, ngộ độc, và các chứng bệnh nguy hiểm khác, nhiều chất tăng nguy cơ mắc bệnh ung thư.

Theo xu thế hiện nay, để bảo vệ sức khỏe của người tiêu dùng cũng như hướng tới mục đích môi sinh, các nhà sản xuất sẽ thiên về sản xuất và sử dụng các chất bảo quản sinh học và chất tạo màu sinh học đối với các sản phẩm thực phẩm và đồ uống. Với việc phát triển khoa học kỹ thuật tăng nhanh, có rất nhiều nhà khoa học chú ý và tập trung vào nghiên cứu các sản phẩm lên men, nhằm tạo ra các phương pháp bảo quản và tạo màu an toàn và đảm bảo sức khỏe con người. Tuy nhiên, các chất bảo quản và chất tạo màu tự nhiên thường khó có thể sử dụng ở quy mô công nghiệp do chi phí lớn, kém bền màu, và màu sắc cũng không đa dạng, đồng nhất.

Gần đây, một loại tương ớt nổi tiếng của Nhật Bản đã được giới thiệu trên thị trường là loại tương ớt lên men không sử dụng chất bảo quản hóa học và chất tạo màu hóa học. Tại Việt Nam, tương ớt Mường Khương được biết đến là loại tương ớt được lên men và không sử dụng chất bảo quản cũng như chất tạo màu.

Tác giả Nguyễn Thị Thanh Thúy và cộng sự đã nghiên cứu phân lập, định danh và sơ bộ xác định đặc tính của các chủng *Bacillus subtilis* có phổ kháng khuẩn rộng từ tương ớt Mường Khương. Theo nghiên cứu này, tương ớt Mường Khương là sản phẩm được lên men tự nhiên từ giống ớt Mường Khương đặc biệt cay, không qua xử lý nhiệt và có thể bảo quản trong điều kiện thường từ 1,5-2 năm. 512 loại khuẩn lạc trong đó có 48 chủng *Bacillus sp.* được phân lập từ 80 mẫu tương ớt Mường Khương. Khả năng kháng khuẩn gây bệnh của chủng phân lập được xác định bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch thông qua đo đường kính vòng ức chế. Bốn chủng kiểm định sử dụng là *Escherichia coli* RG1.1, *Salmonella typhi* GT4.3, *Listeria monocytogenes* MI2.6, *Staphylococcus aureus* TS1.9. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy hai chủng có phổ kháng khuẩn rộng là TO43.13 và TO53.2. Chủng TO43.13 có độ tương đồng về kiểu gen tới 95% so với chủng *B. subtillis* BcX1 (JX504009.1) và *B. subtillis* EPP2 2 (JQ308548.1). Chủng TO53.2 có độ tương đồng về kiểu gen tới 94% so với chủng B. *Subtillis Pe-Lg-1* (FR687210.1) và *B. subtillis* YT2 (HQ143571.1). Điều kiện tối ưu cho

sự sinh trưởng và phát triển của 02 chủng được xác định trong môi trường có nồng độ NaCl 0,6%, pH là 7 và nhiệt độ 35°C.

Do đó, có nhu cầu rất lớn về việc phát triển các chất bảo quản và tạo màu sinh học nhằm thay thế dần các chất phụ gia có nguồn gốc hóa học trong ngành công nghiệp thực phẩm, từ đó phát triển loại tương ớt không chứa các chất bảo quản hóa học cũng như chất tạo màu hóa học để nâng cao chất lượng sản phẩm tương ớt cũng như đảm bảo sức khỏe của người sử dụng tương ớt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết nhu cầu nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học, trong đó chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học là chế phẩm được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum*.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế chứa chế phẩm từ quả táo mèo (*Docynia indica*) được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum*.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế còn chứa chế phẩm từ vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum*.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học này là chế phẩm được lên men chứa chế phẩm từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long, trong đó chế phẩm từ quả táo mèo được lên men làm mồi để lên men chế phẩm từ vỏ quả thanh long.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế là chế phẩm thu được bằng quy trình bao gồm các bước:

(i) tuyển chọn nguyên liệu táo mèo (*Docynia indica*), xử lý và đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh, vi sinh, kim loại nặng để đảm bảo đạt chỉ tiêu và đưa vào quy trình sản xuất và chuẩn bị dịch chiết táo mèo;

(ii) lên men dịch chiết táo mèo: tăng sinh sơ cấp chủng *Acetobacter xylinum* được phân lập và tuyển chọn trong môi trường tự nhiên, trên môi trường dịch chiết táo mèo có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4, nồng độ etanol nằm trong khoảng từ 5 đến 8%, tốt hơn là 6%, và hàm lượng nằm trong khoảng từ 7 đến 10g/l, tốt hơn là 9g/l, đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, tỷ lệ cấp giống là 9% và thời gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C, trong đó một phần dịch lên men táo mèo này được làm mồi cho bước lên men môi trường dịch vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) và phần còn lại được lọc qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ quả táo mèo;

(iii) lên men dịch chiết vỏ quả thanh long: tăng sinh thứ cấp trên môi trường dịch vỏ thanh long đã được điều chỉnh độ pH đến 4,2 và đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, sử dụng dịch lên men táo mèo thu được ở bước (ii) làm mồi cho quá trình lên men, trong đó tỷ lệ dịch lên men táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long là nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:13, tốt hơn là 1:11, và thời gian gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C;

(iv) lọc các dịch lên men ở bước (iii) qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long;

(v) pha trộn chế phẩm lên men từ quả táo mèo thu được ở bước (ii) và chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long thu được ở bước (iv) theo tỷ lệ thích hợp để thu được chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học.

Theo một phương án, tỷ lệ thể tích của chế phẩm lên men từ quả táo mèo so với chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long trong chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 5:10 đến khoảng 8:10.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo khía cạnh trước đó của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế này, hàm lượng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học trong tương ớt là nằm trong khoảng từ 5 đến 20% thể tích.

Mô tả chi tiết sáng chế

Xuất phát từ để mong muốn tạo ra tương ớt sử dụng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học, trong đó chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học là các chiết phẩm thực vật được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men, tác giả sáng chế để tiến hành các nghiên cứu sâu rộng nhằm mục đích nghiên cứu và phát triển chất bảo quản sinh học chứa dịch lên men từ quả táo mèo đồng thời nghiên cứu và phát triển chất tạo màu sinh học từ dịch lên men từ vỏ quả thanh long.

Các tác giả sáng chế hướng tới mục đích đánh giá các hoạt chất trong dung dịch chiết xuất sau khi lên men có hiệu quả kháng khuẩn và chống lão hóa khi chuyển thành axit axetic, tạo ra chất bảo quản thực phẩm và chất tạo màu thực phẩm có tác dụng ức chế hoạt động của vi sinh vật, ngăn ngừa thực phẩm hư hỏng, do đó kéo dài thời hạn sử dụng của thực phẩm.

Tác giả sáng chế đã nghiên cứu các chủng vi khuẩn lên men khác nhau để tìm kiếm chủng tốt nhất thực hiện quá trình lên men các nguyên liệu nêu trên nhằm tạo ra chế phẩm có hoạt tính kháng sinh sinh vật để hữu dụng trong việc sử dụng làm chất bảo quản cũng như tạo màu tự nhiên và đảm bảo các thành phần dinh dưỡng trong các nguyên liệu. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, vi khuẩn *Acetobacter xylinum* đáp ứng tốt nhất các đòi hỏi đã nêu.

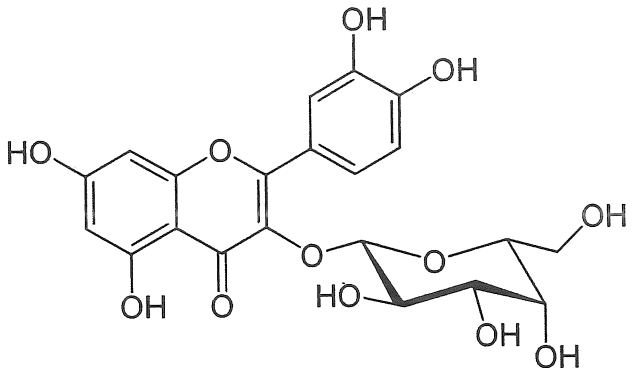
Acetobater xylinum là trực khuẩn không di động, tạo thành váng nhăn và khá dày. Váng này có chứa hemixenluloza nên khi gặp H_2SO_4 và thuốc nhuộm iot sẽ bắt màu xanh. Có thể tích luỹ 4,5% axit axetic trong môi trường. Thường gặp loài vi khuẩn này cùng với nấm men trong "nấm chè", còn gọi là "thuỷ hoài sâm", một loại sản phẩm giải khát bổ dưỡng theo cách làm của nghười Trung Hoa. Đó là một loại nước chua có vị thơm dùng để pha nước giải khát trong các gia đình người Trung Hoa, trên mặt nước có một váng vi sinh vật dày được nuôi sống bằng nước chè và đường.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng và phát hiện ra rằng chiết phẩm từ táo mèo có nhiều tính chất đáng quý trong đó có tính chất kháng vi sinh vật. Dịch lên men của chế phẩm từ quả táo mèo cũng đã được nghiên cứu và cho thấy khả năng diệt vi sinh vật tốt. Dung dịch xit axetic loãng tạo ra trong dịch lên men có khả năng trong việc ức chế sự phát triển của mầm bệnh, ngăn ngừa sự hình thành màng sinh học, và sau đó tiêu diệt màng sinh học đã được tạo thành trước đó và đã được chứng minh trên nhiều chủng vi sinh vật. Nồng độ axit axetic thấp có khả năng ức chế sự tăng trưởng của nhiều chủng vi sinh vật, ngăn cản chúng hình thành màng sinh học và còn tiêu diệt màng sinh học trưởng thành ở các chủng này chỉ sau ba giờ tiếp xúc.

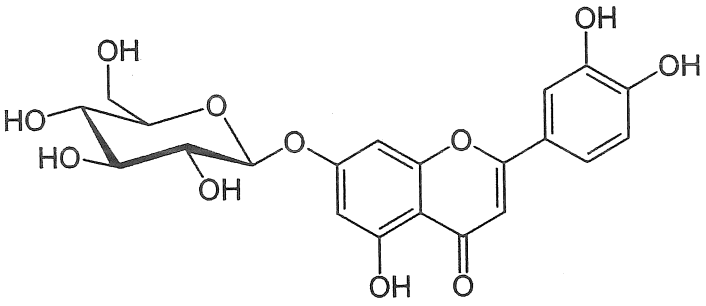
Với các nghiên cứu sâu rộng hơn nữa, các tác giả sáng chế đã tiến hành lên men chế phẩm từ quả táo mèo bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter Xylinum* để tối hóa khả năng diệt vi sinh vật khi tạo ra nồng độ axit axetic vừa đủ cũng như làm giàu hàm lượng flavonoit trong dịch lên men.

Một số hợp chất flavonoit được nhận diện trong dịch lên men từ quả táo mèo (*Docynia indica*) bằng chủng vi sinh vật *Acetobacter xylinum* cũng có hoạt tính kháng vi sinh vật tốt, trong đó có thể kể tới:

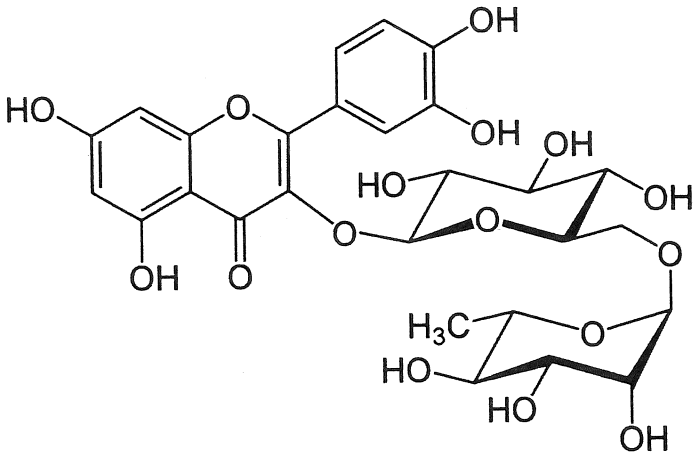
Hyperoside



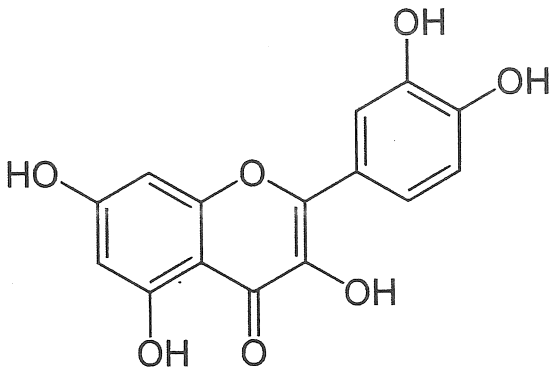
luteolin-7-glucoside



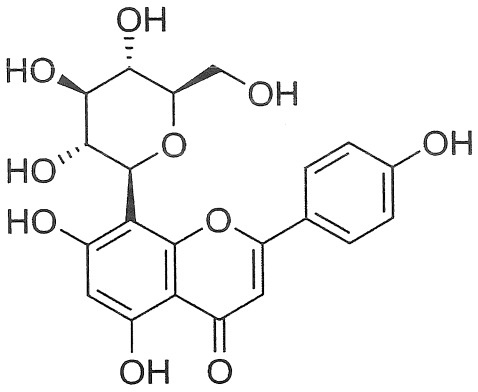
Rutin



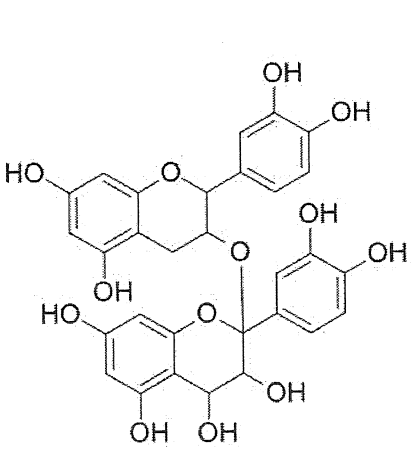
Quercetin

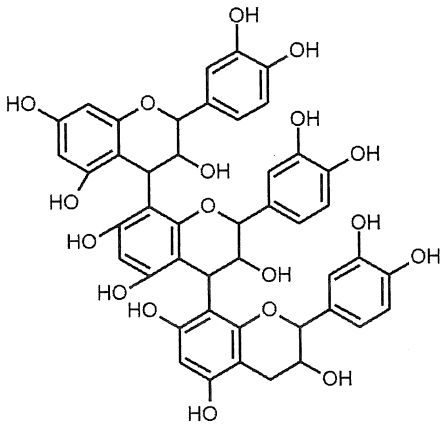


Vitexin

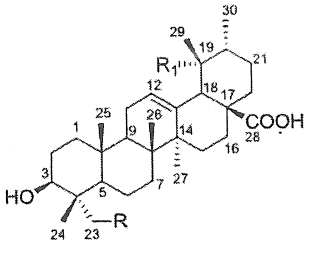


Các nghiên cứu cũng cho thấy rằng sự hiện diện của các oligomeric procyanidin và flavan (catechin, polyme epicatechin) có công thức dưới đây cũng góp phần vào hoạt tính diệt vi sinh vật của dịch lên men.

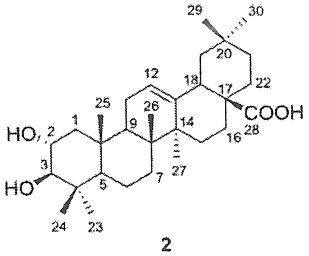




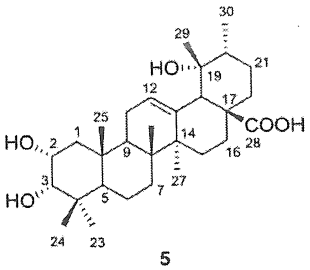
Ngoài ra, các dẫn xuất triterpen được tìm thấy trong dịch lên men cũng có các tính chất diệt vi sinh vật.



1 R = H R_1 = OH
3 R = R_1 = H
4 R = OH R_1 = H



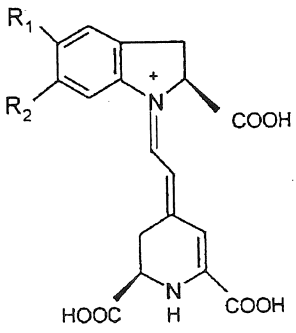
2



5

Để tạo ra khả năng nhuộm màu của chất bảo quản sinh học theo sáng chế cũng như bổ dung các thành phần dinh dưỡng cho sản phẩm tương ớt, các tác giả sáng chế đã tiến hành sử dụng dịch lên men táo mèo làm mồi cho quá trình lên men chế phẩm từ vỏ quả thanh long, nhằm tận dụng môi trường axit có trong dịch lên men quả táo mèo gây ức chế vi sinh vật ngoại lai và tạo đà cho quá trình lên men được thuận lợi.

Vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) có chứa các thành phần tạo màu tự nhiên là các chất betacynin với các ưu điểm như có mùi thơm tự nhiên, không độc hại. Đa số các betacyanin được tạo thành do phản ứng glucosyl hóa một trong hai nhóm chức – OH tự do của vòng cyclo-DOPA của betanidin, trong đó thường gặp nhất là sự glucosyl hóa ở vị trí 5. Dẫn xuất betacyanin quan trọng và thường gặp nhất trong tự nhiên là betacyanin.



Betacyanins

Betacyanin là chất màu rất nhạy cảm với nhiệt độ cao và bị phân hủy mạnh nhất ở nhiệt độ 90°C, đồng thời hợp chất này cũng nhạy với độ pH, betacyanin sẽ bền màu hơn ở độ pH thấp. Do đó, các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu và đưa ra quy trình lên men mà chất tạo màu này được bền hóa trong quá trình lên men và do đó tạo ra màu tự nhiên cũng như hương tự nhiên cho thành phẩm theo sáng chế.

Vi khuẩn *Acetobacter* có thể được phân lập từ giấm, rượu, bia, hoa quả, chuối chín, váng giấm...Ví dụ: muốn phân lập vi khuẩn *Acetobacter*, theo kinh nghiệm dân gian, lấy một phần rượu hoà với 7 phần nước lã, đựng trong cốc miệng rộng, giữ ở tủ ấm 30°C trong 2-3 ngày, rượu sẽ đục và trên bề mặt xuất hiện một váng mỏng, tiếp đó lấy váng mỏng này pha loãng ra, và phân lập trên môi trường thạch đĩa.

Giống *Acetobacter xylinum* có thể được nuôi trong môi trường thạch nghiêng chứa các thành phần $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, sacaroza, agar, trong tủ ấm với thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 4 ngày. Giống tốt được lựa chọn và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 4°C để tiếp tục nhân giống tùy thuộc quy mô mẻ lên men.

Sau khi chuẩn bị nguyên liệu và xử lý và đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh, vi sinh, kim loại nặng để đảm bảo đạt chỉ tiêu và đưa vào quy trình sản xuất, vi khuẩn *Acetobacter xylinum* được tăng sinh sơ cấp trong môi trường quả táo mèo. Môi trường quả táo mèo có thể là quả táo mèo được xay nhỏ, dịch chiết bằng dung môi như etanol hoặc nước, hoặc dịch ép từ quả táo mèo.

Thông thường, để ức chế sự phát triển của các loại nấm men *Mycoderma* mà phát triển đồng thời với sự phát triển của vi khuẩn *Acetobacter*, môi trường nuôi cấy vi khuẩn luôn chứa từ 1 đến 1,5% axit axetic. Vì vậy, dịch chiết etanol của táo mèo là rất phù hợp cho việc tăng sinh sơ cấp chủng vi khuẩn này khi vừa là môi trường tốt cho vi khuẩn phát triển, đồng thời cũng chứa hàm lượng axit axetic đủ để có thể ức chế các loại nấm men *Mycoderma*.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tương ớt sử dụng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học, trong đó chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học chứa chế phẩm từ quả táo mèo được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum*.

Dịch chiết etanol của quả táo mèo có thể thu được bằng các phương pháp chiết thông thường như chiết phân đoạn, chiết ngâm, chiết siêu tới hạn. Sau khi có dịch chiết từ quả táo mèo, dịch chiết này có thể được điều chỉnh các thông số về độ pH, nồng độ etanol, hàm lượng đường,v.v..

Các tác giả đã nghiên cứu và thấy rằng điều kiện lên men tốt nhất đối với các thông số là độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4 bằng dung dịch axit axetic, nồng độ etanol của dịch trước khi lên men tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5 đến 8%, tốt hơn là 6%, hàm lượng đường tốt nhất là nằm trong khoảng từ 7 đến 10g/l, tốt hơn là 9g/l.

Hàm lượng đường được xác định bằng phương pháp Ferixianua Kali, hàm lượng etanol được xác định bằng phương pháp đo nồng độ cồn Salleron Duardin Paris.

Tỷ lệ giống cũng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình lên men, nếu tỷ lệ giống quá thấp sẽ có ít vi khuẩn lên men axetic và dẫn đến thời gian lên men kéo dài, hiệu quả sẽ không cao và có các vi khuẩn khác phát triển mạnh. Ngược lại, nếu có quá nhiều vi khuẩn lên men axetic sẽ dẫn đến các oxi và các chất dinh dưỡng không đủ và hiệu quả của quá trình lên men cũng bị giảm. Tỷ lệ tiếp giống tốt nhất là nằm trong khoảng từ 7 đến 9%.

Các tác giả sáng chế đã tối ưu tỷ lệ tiếp giống và thời gian lên men và đi đến kết luận tỷ lệ tiếp giống tốt nhất là 8,5% và thời gian lên men là 4,5 ngày.

Nhiệt độ lên men trong bước này thường nằm trong khoảng từ đến 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C. Sản phẩm lên men sau bước này có độ pH nằm trong khoảng từ 2,8 đến 3 và được sử dụng để lên men chế phẩm vỏ thanh long đỏ.

Nguyên liệu vỏ quả thanh long cần được làm sạch, cắt nhỏ, tiếp đó xay nhiễn để có thể được lên men trực tiếp hoặc chiết xuất bằng dung môi trước khi lên men. Theo một

phương án được ưu tiên, chế phẩm từ vỏ quả thanh long để lên men theo sáng chế là sản phẩm thu được từ vỏ qua thanh long được xay nhuyễn.

Các nguyên liệu nếu được lên men trực tiếp có thể được xử lý để giảm nồng độ kim loại nặng hoặc các muối khác. Nồng độ muối của một môi trường cụ thể cũng có tác động tương ứng đến quá trình lên men vì hoạt động tế bào của vi sinh vật bị ảnh hưởng bởi nồng độ muối.

Tất cả các nguyên liệu cũng được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian khoảng từ 15 phút trước khi được cấy vi khuẩn để lên men.

Do đó, theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế còn chứa chế phẩm từ vỏ quả thanh long được lên men bằng chủng vi khuẩn lên men *Acetobacter xylinum*.

Các bước lên men chế phẩm từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long có thể được tiến hành riêng rẽ trong các bể lên men khác nhau hoặc trong cùng một bể. Được ưu tiên là các chế phẩm từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long được lên men trong bể riêng rẽ.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế là chế phẩm được lên men riêng rẽ chế phẩm từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long, trong đó dịch len men táo mèo được làm mồi để lên men chế phẩm từ vỏ quả thanh long.

Quá trình lên men dịch vỏ quả thanh long được tiến hành bằng cách sử dụng dịch lên men táo mèo thu được ở bước tăng sinh sơ cấp làm mồi cho quá trình lên men dịch vỏ quả thanh long nhằm tận dụng môi trường axit có trong dịch lên men táo mèo gây ức chế vi sinh vật ngoại lai và tạo đà cho quá trình lên men được thuận lợi. Trước khi lên men, dịch vỏ quả thanh long được thanh trùng ở điều kiện nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút để đảm bảo giữ được nhiều nhất giá trị dinh dưỡng cũng như hàm lượng hoạt chất sinh học có trong chế phẩm nguyên liệu, đặc biệt là tránh sự phân hủy của chất tạo màu betacyanin có mặt trong đó. Tỷ lệ dịch lên men táo mèo và chế phẩm từ vỏ thanh long là

nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:13, tốt hơn là 1:11. Thời gian lên men ở bước này là nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày với điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C.

Trong các bước lên men này, *A. xylinum* chuyển hóa etanol có sẵn hoặc etanol sinh ra trong quá trình lên men thành axit axetic đồng thời không làm ảnh hưởng đến các thành phần kháng vi sinh vật có trong chế phẩm từ quả táo mèo và vỏ quả thanh long như các hợp chất flavonoit hay betacyanin, nhờ vậy vẫn giữ được các tính chất tạo màu cũng như các thành phần diệt vi sinh vật này.

Các hợp chất flavonoit được phân tích định tính bằng cách sử dụng phản ứng Shinoda và các alkanoit được phân tích định tính bằng cách sử dụng thuốc thử Dragendorf.

Việc kiểm soát độ pH trước, trong và sau quá trình lên men là quan trọng để có được quá trình lên men tối ưu cho việc sinh trưởng của vi khuẩn lên men cũng như chọn thời điểm để kết thúc quá trình lên men cho phù hợp. Chế phẩm vỏ quả thanh long được điều chỉnh độ pH đến 4,2 để tạo môi trường tốt cho cho vi khuẩn *A. xylinum* phát triển và thực hiện quá trình lên men.

Sau khi lên men, độ pH của sản phẩm ở bước lên men chế phẩm vỏ quả thanh long nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,5. Hàm lượng axit axetic được xác định dựa trên phương pháp trung hòa bằng dung dịch kiềm và chất chỉ thị phenolphthalein, và đối với cả hai sản phẩm lên men chế phẩm vỏ quả thanh long nằm trong khoảng từ 3 đến 4,3g/lít, tùy theo từng mẻ lên men và lần chuẩn độ.

Các dịch lên men sẽ được lọc qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được các dịch lên men táo mèo và dịch lên men vỏ quả thanh long sử dụng cho chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế.

Theo một phương án, chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt theo sáng chế là chế phẩm thu được bằng quy trình bao gồm các bước:

(i) tuyển chọn nguyên liệu táo mèo, xử lý và đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh, vi sinh, kim loại nặng để đảm bảo đạt chỉ tiêu và đưa vào quy trình sản xuất và chuẩn bị dịch chiết táo mèo;

(ii) lên men dịch chiết táo mèo: tăng sinh sơ cấp chủng *Acetobacter xylinum,* được phân lập và tuyển chọn trong môi trường tự nhiên, trên môi trường dịch chiết táo mèo có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4, nồng độ etanol nằm trong khoảng từ 5 đến 8%, tốt hơn là 6%, và hàm lượng nằm trong khoảng từ 7 đến 10g/l, tốt hơn là 9g/l, đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, tỷ lệ cấp giống là 9% và thời gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C, trong đó một phần dịch lên men táo mèo này có thể được làm mồi cho bước lên men môi trường dịch vỏ quả thanh long và phần còn lại được lọc qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ quả táo mèo;

(iii) lên men dịch chiết vỏ quả thanh long: tăng sinh thứ cấp trên môi trường dịch vỏ thanh long, đã được điều chỉnh độ pH đến 4,2 và đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, sử dụng dịch lên men táo mèo thu được ở bước (ii) làm mồi cho quá trình lên men, trong đó tỷ lệ dịch lên men táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long là nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:13, tốt hơn là 1:11, và thời gian gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C;

(iv) lọc các dịch lên men ở bước (iii) qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long;

(v) pha trộn chế phẩm lên men từ quả táo mèo thu được ở bước (ii) và chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long thu được ở bước (iv) theo tỷ lệ thích hợp để thu được chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học.

Theo một phương án, tỷ lệ thể tích của chế phẩm lên men từ quả chua so với chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long trong chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 5:10 đến khoảng 8:10.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo khía cạnh trước đó của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế này, hàm lượng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học trong tương ớt là nằm trong khoảng từ 5 đến 20% thể tích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thiết bị chuẩn bị cho việc lên men các chế phẩm từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long bao gồm:

- Bể lên men 150 lít có vỏ bằng thép không gỉ,
- Bơm điều khiển,
- Tủ điện điều khiển,
- Bộ trao đổi nhiệt,
- Biến tần điều khiển tốc độ và mô tô giảm tốc khuấy,
- Van an toàn,
- Cảm biến nhiệt độ và bộ hiện thị,
- Cánh khuấy inox.

Ngoài ra, các thiết bị khác cần thiết cho các bước trước, trong và sau quy trình lên men cũng được chuẩn bị hoặc mua trên thị trường.

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế

Chuẩn bị chế phẩm lên men từ quả táo mèo

Vi khuẩn *Acetobacter xylinum* chọn lọc trong môi trường tự nhiên và được nuôi cấy trong bình tam giác với môi trường thạch nghiêng chứa các thành phần $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, sacaroza, agar, trong tủ ấm với thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 4 ngày.

Nguyên liệu táo mèo được tuyển chọn loại bỏ quả thối hoặc sâu, xử lý và đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh, vi sinh, kim loại nặng để đảm bảo đạt chỉ tiêu và đưa vào quy trình sản xuất.

Nguyên liệu táo mèo cả quả được rửa sạch và cắt nhỏ và được chiết ngâm bằng etanol để thu được dịch chiết etanol táo mèo. Dịch chiết táo mèo sau đó được điều chỉnh để có độ pH khoảng 3,8, nồng độ etanol là khoảng 6%, và hàm lượng đường khoảng 9g/l. Tiếp đó, thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút.

Cấy truyền vi khuẩn *Acetobacter xylinum* vào dịch chiết táo mèo đã thanh trùng với tỷ lệ khoảng 8,5% để bắt đầu giai đoạn lên men. Thời gian gian lên men là 4,5 ngày ở nhiệt độ khoảng 30°C.

Một phần dịch lên men được sử dụng làm mồi cho bước lên men dịch vỏ quả thanh long và mà không cần xử lý thêm.

Phần còn lại được lọc qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ quả táo mèo. Dung dịch sau lên men ở bước này có độ pH bằng khoảng 3 là dạng dung dịch trong, màu sắc tươi sáng, và có hương thơm đặc trưng.

Hàm lượng axit axetic nằm trong khoảng 4g/lít. Phân tích định tính các hợp chất flavonoit bằng các sử dụng phản ứng Shinoda và phân tích định tính các alkanoit bằng cách sử dụng thuốc thử Dragendorf cho thấy sự hiện diện của các hợp chất này trong chế phẩm lên men.

Chuẩn bị chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long

Nguyên liệu vỏ quả thanh long được rửa sạch và xay nhỏ với việc bổ sung nước sạch. Cho nguyên liệu đã xay nhỏ, điều chỉnh độ pH ở khoảng 4,2, cho vào bồn lên men và thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút.

Bổ sung chế phẩm lên men từ quả táo mèo thu được ở bước trước làm mồi cho quá trình lên men với tỷ lệ chế phẩm lên men từ quả táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long là 1:11, và tiến hành lên men nằm trong thời gian 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C;

Sau khi kết thúc quá trình lên men, lọc dịch lên men qua thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ vỏ quả là dạng dung dịch trong, màu sắc tươi sáng và có mùi hương dịu, không gắt.

Chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long có độ pH là khoảng 3. Hàm lượng axit axetic nằm trong khoảng từ 3,8g/lít.

Pha chế chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế

Các chế phẩm lên men từ quả táo và chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long thu được sau khi lọc ở các bước trước đó được pha vào với nhau theo tỷ lệ thích thể tích của chế phẩm lên men từ quả táo mèo so với chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long là 7:10, để tạo ra chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế.

Ví dụ 2: Sản xuất tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế

Tương ớt được sản xuất theo các quy trình sản xuất thông thường và không sử dụng các chất bảo quản và chất tạo màu hóa học. Sau đó tương ớt này được bổ sung chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế với tỷ lệ 15% thể tích và trộn đều và đóng chai để tạo thành phẩm.

Tương ớt sử dụng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo sáng chế có thể ổn định về chất lượng trong thời gian lên tới 24 tháng.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt, trong đó quy trình bao gồm các bước:

(i) tuyển chọn nguyên liệu táo mèo (*Docynia indica*), xử lý và đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh, vi sinh, kim loại nặng để đảm bảo đạt chỉ tiêu và đưa vào quy trình sản xuất và chuẩn bị dịch chiết táo mèo;

(ii) lên men dịch chiết táo mèo: tăng sinh sơ cấp chủng *Acetobacter xylinum* đã được phân lập và tuyển chọn trong môi trường tự nhiên, trên môi trường dịch chiết táo mèo có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4, nồng độ etanol nằm trong khoảng từ 5 đến 8%, tốt hơn là 6%, và hàm lượng nằm trong khoảng từ 7 đến 10g/l, tốt hơn là 9g/l, đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, tỷ lệ cấp giống là 9% và thời gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C, trong đó một phần dịch lên men táo mèo này được làm mồi cho bước lên men dịch chiết vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) và phần còn lại được lọc qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ quả táo mèo;

(iii) lên men dịch chiết vỏ quả thanh long: tăng sinh thứ cấp trên môi trường dịch vỏ quả thanh long đã được điều chỉnh độ pH đến 4,2 và đã được thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 15 phút, sử dụng dịch lên men táo mèo thu được ở bước (ii) làm mồi cho quá trình lên men, trong đó tỷ lệ dịch lên men táo mèo và chế phẩm từ vỏ quả thanh long là nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:13, tốt hơn là 1:11, và thời gian gian lên men nằm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 31°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 29°C đến 30°C;

(iv) lọc dịch lên men ở bước (iii) qua màng lọc hoặc thiết bị lọc khung bản để thu được chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long;

(v) pha trộn chế phẩm lên men từ quả táo mèo thu được ở bước (ii) và chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long thu được ở bước (iv) theo tỷ lệ thể tích của chế phẩm lên men từ quả táo mèo so với chế phẩm lên men từ vỏ quả thanh long nằm trong khoảng từ 5:10 đến khoảng 8:10.

2. Chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học dùng cho tương ớt thu được từ quy trình nêu trong điểm 1.

3. Tương ớt chứa chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học theo điểm 2.

4. Tương ớt theo điểm 3, trong đó hàm lượng chế phẩm bảo quản và tạo màu sinh học là nằm trong khoảng từ 5 đến 20% thể tích.