



(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) 
1-0020083

(51)⁷ **A23K 1/16, A01N 37/02, A01P 3/00,**
C02F 1/50

(13) **B**

(21)	1-2012-00427	(22)	03.08.2010		
(86)	PCT/US2010/044305	03.08.2010	(87)	WO2011/017367	10.02.2011
(30)	61/231,930	06.08.2009	US		
(45)	26.11.2018	368	(43)	25.06.2012	291
(73)	ANITOX CORPORATION (US) 1055 Progress Circle, Lawrenceville, GA 30043, United States of America				
(72)	Kurt RICHARDSON (US), Julio PIMENTEL (US), James D. WILSON (US)				
(74)	Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)				

(54) **CHẾ PHẨM KHÁNG VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP KÉO DÀI THỜI GIAN SỬ DỤNG NƯỚC, THỨC ĂN HOẶC THÀNH PHẦN THỨC ĂN**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng vi sinh vật để kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn để dùng cho động vật chứa axit propionic hoặc axit axetic đã đệm được trộn với axit pelargonic. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn sử dụng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến chế phẩm kháng vi sinh vật là hỗn hợp gồm các axit hữu cơ gồm cả axit pelargonic và phương pháp kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn và các thành phần chính của thức ăn bằng cách xử lý phun hoặc trộn chế phẩm này vào nước, thức ăn hoặc các thành phần chính của thức ăn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh do thực phẩm gây ra là vấn đề chung đối với hàng triệu người trên thế giới. Bệnh gây ra qua thực phẩm do nhiều vi sinh vật khác nhau, bao gồm các bệnh lây nhiễm do *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersenia enterocolitica*, *Salmonella* spp. và *E. coli* là các vi sinh vật phổ biến ở nhiều quốc gia. Số liệu thống kê của Cơ quan Kiểm soát và Phòng ngừa Bệnh tật (Center for Disease Control and Prevention) ở Mỹ chỉ ra rằng 76 triệu người bị ốm mỗi năm do tiêu thụ thịt, trứng, cá sống, các sản phẩm sữa chưa thanh trùng và rau chưa rửa. Động vật làm thực phẩm là nguồn chính của các chủng *Salmonella enterica* kiểu huyết thanh không typhi, mà là nguyên nhân của khoảng 1,4 triệu ca bệnh, 16.400 ca nằm viện và 580 ca tử vong tại Mỹ mỗi năm.

Salmonella là sinh vật gây bệnh không bắt buộc nội bào có khả năng thâm nhập vào cơ thể người và động vật gây viêm nhiễm. Sau khi vào cơ thể, *Salmonella* có thể thoát khỏi sự hạn chế ở ruột, thâm qua ruột và được vận chuyển theo máu đến các cơ quan nội tạng (Henderson, S. et. al., 1999, *Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis*, *Infect. Immun.* 67(7): 3580-3586).

Phần lớn các ca nhiễm *Salmonella* ở người xảy ra do tiêu thụ trứng gà. Hai ngày sau khi gà mái được gây nhiễm *Salmonella* qua đường miệng, vi khuẩn này có thể được phát hiện thấy ở lá lách, gan, tim, mô túi mật, mô ruột và các phần khác nhau của vôi trứng (Humphrey, T.J. et. al, 1994, *Contamination of egg shell and contents with Salmonella enteritidis*, *Int. J. Food Microbiol* 21 (1-2): 31-40). Một số yếu tố có trong trứng giúp cho việc duy trì nồng độ *Salmonella* thấp hơn trong

trứng mới đẻ (tỷ lệ nhiễm 0,6%) mặc dù trứng từ vôi trứng của cùng gà mái đó có nồng độ *Salmonella* cao hơn (tỷ lệ nhiễm 29%); các yếu tố này có thể bao gồm kháng thể, enzym kháng vi khuẩn và các protein cào hóa sắt và các protein ức chế proteaza của vi khuẩn trong lòng đỏ trứng và lòng trắng trứng (Keller, L.H. et. al., 1995, *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infec. Immun.* 63(7): 2443-2449).

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella*, *E. coli* và *Enterococcus* thay đổi tùy theo loại nguyên liệu được sử dụng trong việc sản xuất thức ăn động vật. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong thực phẩm có nguồn gốc động vật (35%) là cao hơn trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật (5%). Tỷ lệ nhiễm *E. coli* là tương tự trong cả hai loại thực phẩm có nguồn gốc động vật và thực phẩm có nguồn gốc thực vật (40%), nhưng tỷ lệ nhiễm *Enterococcus* là 80% trong thực phẩm có nguồn gốc động vật và 91% trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong thức ăn cho động vật ở dạng cám gia súc là cao hơn ở dạng viên. Việc tạo viên trong các điều kiện nhiệt độ cao và áp suất cao làm giảm số lượng không chỉ *Salmonella* mà cả các vi khuẩn khác. Vấn đề với việc tạo viên đơn giản là không có biện pháp bảo vệ đối với hiện tượng tái nhiễm vi khuẩn ở thức ăn gia súc trước khi nó được tiêu thụ bởi động vật, như trong quá trình đóng gói, vận chuyển và cho ăn.

Sự xuất hiện bệnh ỉa chảy ở bê có tầm quan trọng về mặt kinh tế. Hơn 90% ca bệnh ỉa chảy ở bê là do *E. coli* và *Salmonella* và *Clostridia* gây ra. Các phương pháp phòng ngừa là đã biết, như (1) tiêm phòng cho bò mẹ nhằm truyền một cách thụ động các kháng thể trong sữa non; (2) sử dụng các chất bổ sung miễn dịch cho các sản phẩm thay thế sữa; (3) sử dụng các vi khuẩn có lợi để tạo ra môi trường mạnh khỏe trong dạ dày-ruột, và (4) thay đổi trong chăn nuôi. Trong số này, không có biện pháp bảo vệ nào có hiệu quả 100%.

Tỷ lệ mắc bệnh ỉa chảy ở lợn sơ sinh và lợn con đang cai sữa cũng là rất cao. *E. coli* và *Salmonella* cũng là các vi sinh vật chính tham gia vào bệnh ỉa chảy ở lợn. Một trong số các phương pháp được ưu tiên để ngăn ngừa vấn đề này là cai sữa sớm cách ly (segregated early weaning - SEW). Cơ sở cho việc cai sữa sớm là lợn con được cai sữa khỏi lợn nái càng sớm, thì cơ hội lây chéo bệnh giữa lợn nái và

lợn con càng thấp. Trong cả trường hợp bệnh ỉa chảy ở bê và bệnh ỉa chảy ở lợn con, phương pháp điều trị được ưu tiên là dùng kháng sinh.

Ủy ban châu Âu (European Community - EU) đã cấm sử dụng năm loại kháng sinh và Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (Food and Drug Administration - FDA) ở Mỹ đang cấm sử dụng floquinolon cho động vật do gây ra hiện tượng kháng thuốc đối với kháng sinh này. Hiện tượng kháng thuốc ở vi khuẩn thúc đẩy việc phát triển các sản phẩm thay thế kháng sinh. Tất cả các quốc gia châu Âu đã cấm sử dụng kháng sinh làm tác nhân thúc đẩy sinh trưởng, và việc này đã được mở rộng đến tất cả các nước xuất khẩu thịt hoặc các sản phẩm có nguồn gốc từ thịt vào châu Âu.

Nhiều sản phẩm đã được phát triển để bảo quản nước và thức ăn cho động vật, bao gồm các chất phụ gia cho nước như các sản phẩm amoni bậc bốn, các sản phẩm trên cơ sở clorit, clo hóa, clo dioxit, và các axit hữu cơ (axetic, sorbat, ascorbic, xitric, formic).

Các phương pháp bảo quản thức ăn bao gồm phương pháp xử lý bằng nhiệt, axit hữu cơ, formaldehyt, tinh dầu và chiếu xạ. Việc loại bỏ *Salmonella* bằng các axit hữu cơ đòi hỏi xử lý ở mức độ cao, tức là mang đến chi phí cao cho ngành chăn nuôi. Việc chiếu xạ thức ăn là không có hiệu quả về mặt chi phí và không thân thiện với người tiêu dùng. Natri percacbonat là chất oxy hóa mạnh được sử dụng làm tác nhân kháng vi sinh vật trong thức ăn ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 2% thức ăn.

Việc xử lý bằng clorat được khuyến cáo đối với *E coli* và *Salmonella* vì các vi khuẩn này có enzyme nitrat reductaza khử clorat thành clorit, là chất có tính kháng vi sinh vật. Các con lợn nhiễm *Salmonella* khi được dùng các ion clorat qua nước trước khi làm thịt có số lượng vi khuẩn trong ruột và mô bạch huyết giảm (Anderson, R.C. et. al. 2004, *Effect of drinking-water administration of experimental chlorate ion preparations on Salmonella enterica serovar Typhimurium colonization in weaned and finished pigs*, Vet. Res. Comm. 28(3): 179-189).

Các axit hữu cơ đã được sử dụng làm chất phụ gia chính để làm giảm tỷ lệ lây nhiễm do thực phẩm gây ra. Đã có thông báo rằng các axit béo mạch ngắn, mạch vừa và mạch dài, ví dụ, axit formic, propionic, butyric, lactic, xitric, malic và

các axit khác được sử dụng một cách thành công trong một số trường hợp. Các axit béo mạch ngắn thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật do các nhóm axit (không ion hóa) RCOOH phân ly thấm lipid, và do đó có thể đi qua thành tế bào vi khuẩn và phân ly trong môi trường bên trong kiềm tính hơn của vi sinh vật ($\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$) khiến cho tế bào chất không thể tồn tại được. Việc sử dụng các axit hữu cơ, đặc biệt là axit formic và axit propionic, đã được mô tả kỹ trong các tài liệu kỹ thuật chuyên ngành. Tuy nhiên, axit pelargonic chỉ được gọi là chất diệt cỏ và chất diệt nấm dùng cho thực vật, không được dùng để bảo quản nước và thức ăn cho động vật.

Axit pelargonic là axit béo có trong tự nhiên tìm thấy được ở hầu hết tất cả các loài động vật và thực vật. Do có chín nguyên tử cacbon, nên nó còn được gọi là axit nonanoic có công thức hóa học $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$. Hợp chất này được tìm thấy ở nồng độ thấp trong nhiều loại thực phẩm thông thường và dễ bị phân hủy trong môi trường. Hợp chất này là chất lỏng không màu tính dầu mà hóa rắn ở nhiệt độ thấp. Nó có mùi ôi khó chịu và hầu như không hòa tan trong nước.

Axit pelargonic được sử dụng làm chất diệt cỏ không chọn lọc. Scythe (chứa 57% axit pelargonic, 3% axit béo liên quan và 40% nguyên liệu trợ) là chất diệt cỏ phổ rộng dùng sau khi cỏ nảy mầm hoặc đưa vào đất do Mycogen/Dow Chemicals sản xuất. Nguyên lý hoạt động diệt cỏ của axit pelargonic trước hết là do hiện tượng lọt qua màng trong bóng tối hoặc ánh sáng, và sau đó là do sự peroxy hóa bởi các gốc được tạo ra trong ánh sáng bởi diệp lục tổng hợp thay thế cho màng lục lạp (B. Lederer, T. Fujimori., Y. Tsujino, K. Wakabayashi and P. Boger; *Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects*. Pesticide Biochemistry and Physiology 80:151-156).

Chadeganipour và Haims (*Antifungal activities of pelargonic and axit capric on Microsporum gypseum* Mycoses Vol. 44, Number 3-4 pp 109-112, 2001) đã chứng minh được nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibition concentration - MIC) để ngăn ngừa sự sinh trưởng của *M. gypseum* trên môi trường rắn là 0,02mg/ml axit capric, và 0,04mg/ml axit pelargonic. Trong môi trường lỏng, nồng độ này là 0,075mg/ml axit capric, và 0,05mg/ml axit pelargonic. Các axit này được thử nghiệm một cách độc lập và không ở dạng hỗn hợp.

N. Hirazawa và các đồng tác giả. (*Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against ciliated Crptocaryon irritans infestation in the red sea bream Pagrus major*, Aquaculture, 198:219-228, 2001) đã phát hiện ra rằng axit nonanoic cũng như các axit béo có từ 6 đến 10 nguyên tử cacbon có tác dụng trong việc kiểm soát sự phát triển của *C. irritans* ký sinh và các hợp chất có 8, 9 và 10 nguyên tử cacbon có hiệu quả cao hơn.

Đã phát hiện ra rằng *Trichoderma harzianum*, là đối chứng sinh học cho cây cacao, tạo ra nhiều hợp chất, trong đó có axit pelargonic, và có tác dụng trong việc kiểm soát mức độ nảy mầm và sinh trưởng của các sinh vật gây bệnh ở cây cacao. (M. Aneja, T. Gianfagna and P. Hebbar, *Trichoderma harzianum produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens*, Physiological and Molecular Plant Pathology 67:304-307, 2005).

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2004/0266852, bộc lộ chế phẩm diệt nấm dùng cho các mục đích nông nghiệp chứa một hoặc nhiều axit béo và một hoặc nhiều axit hữu cơ không phải là axit béo. Trong hỗn hợp gồm các axit hữu cơ và axit béo này, axit hữu cơ hoạt động như chất có tác dụng hiệp đồng hiệu nghiệm đối với axit béo làm chế phẩm diệt nấm.

Patent Mỹ số 5,366,995 bộc lộ phương pháp tiệt trừ bệnh nhiễm nấm và nhiễm khuẩn ở thực vật và để nâng cao hoạt tính của các chất diệt nấm và các chất diệt khuẩn ở thực vật bởi axit béo và các chất dẫn xuất của chúng bằng chế phẩm chứa 80% axit pelargonic hoặc các muối của nó để kiểm soát nấm ở thực vật. Axit béo được sử dụng chủ yếu có từ 9 đến 18 nguyên tử cacbon.

Patent Mỹ số 5,342,630 bộc lộ thuốc trừ sâu dùng cho thực vật chứa axit vô cơ làm tăng hiệu quả của axit béo với mạch có 8 đến 22 nguyên tử cacbon. Một trong số các ví dụ là sản phẩm bột chứa 2% axit pelargonic, 2% axit capric, 80% talc, 10% natri cacbonat và 5% kali cacbonat.

Patent Mỹ số 5,093,124 bộc lộ chế phẩm diệt nấm và chế phẩm diệt động vật chân khớp cho thực vật chứa các axit mono alpha carboxylic và các muối của chúng có độc tính giảm đối với thực vật. Tốt hơn, nếu chế phẩm diệt nấm có mạch gồm ít nhất từ 9 đến 10 nguyên tử cacbon, được trung hòa không hoàn toàn bởi kim loại kiềm hoạt tính như kali. Hỗn hợp này bao gồm 40% thành phần hoạt tính hòa

tan trong nước và 10% axit pelargonic, 10% axit capric và 20% axit béo từ dừa, tất cả các axit này được trung hòa bằng kali hydroxit.

Patent Mỹ số 6,596,763 bộc lộ phương pháp kiểm soát bệnh lây nhiễm ở da bao gồm việc sử dụng axit béo với mạch có từ 6 đến 18 nguyên tử cacbon hoặc các chất dẫn xuất của chúng.

Patent Mỹ số 6,103,768 và patent Mỹ số 6,136,856 bộc lộ lợi ích đặc biệt của axit béo và các chất dẫn xuất để diệt trừ bệnh nhiễm nấm và nhiễm khuẩn ở thực vật. Phương pháp này không mang tính phòng ngừa nhưng có hiệu quả đối với bệnh nhiễm đã xảy ra. Sharpshooter, là sản phẩm có bán trên thị trường, chứa 80% axit pelargonic, 2% chất nhũ tương và 18% chất hoạt động bề mặt có hiệu quả đối với *Penicillium* và *Botrytis* spp..

Patent Mỹ số 6,638,978 bộc lộ chế phẩm bảo quản có tính kháng vi sinh vật chứa este của axit béo và glyxerol, hỗn hợp nhị phân gồm một axit béo (có từ 6 đến 18 nguyên tử cacbon) và axit béo thứ hai (có từ 6 đến 18 nguyên tử cacbon), trong đó axit béo thứ hai này khác với axit béo thứ nhất, để bảo quản thực phẩm.

WO 01/97799 bộc lộ việc sử dụng axit béo mạch vừa làm chất kháng vi sinh vật. Đã chứng minh được rằng sự tăng độ pH từ 6,5 đến 7,5 làm tăng nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibition concentration - MIC) của axit béo mạch ngắn có từ 6 đến 8 nguyên tử cacbon.

Axit pelargonic được sử dụng làm thành phần trong dung dịch vệ sinh bề mặt tiếp xúc với thực phẩm trong các nhà máy chế biến thực phẩm. Sản phẩm của EcoLab chứa 6,49% axit pelargonic làm thành phần hoạt tính để dùng làm chất vệ sinh cho tất cả các bề mặt tiếp xúc với thực phẩm (12 CFR 178,1010 b).

Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration - FDA) đã cấp phép cho việc sử dụng axit pelargonic làm tác nhân tạo vị nhân tạo trong thực phẩm (21 CFR 172,515), làm chất phụ trợ, chất hỗ trợ sản xuất và chất vệ sinh để sử dụng khi tiếp xúc với thực phẩm (12 CFR 178,1010 b) và để rửa bát hoặc để trợ giúp việc bóc vỏ hoa quả và rửa rau quả bằng dung dịch kiềm (12 CFR 173.315).

Axit pelargonic được Bộ Nông nghiệp Mỹ (US Department of Agriculture – USDA) liệt kê trong danh mục các hóa chất được Bộ Nông nghiệp Mỹ cấp phép sử dụng, năm 1990, Chương 5.14, Các hợp chất dùng để rửa rau quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm kháng vi khuẩn để kéo dài thời gian sử dụng của nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn, chứa: dung dịch nước chứa các axit hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 99%, là hỗn hợp gồm các axit hữu cơ C2:C9 hoặc C3:C9, được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 5; từ 0 đến 20% trọng lượng terpen, và từ 0,5 đến 10% chất hoạt động bề mặt; trong đó nồng độ của axit có 9 nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ 2 đến 20% tổng lượng axit hữu cơ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn, trong đó phương pháp này bao gồm bước: xử lý bằng cách phun hoặc trộn với nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn chính, lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa dung dịch nước chứa các axit hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 99%, là hỗn hợp gồm các axit hữu cơ C2:C9 hoặc C3:C9, được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 5; từ 0% đến 20% trọng lượng terpen, và từ 0,5% đến 10% chất hoạt động bề mặt; trong đó nồng độ axit có 9 nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ 2% đến 20% tổng lượng axit hữu cơ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa:

Thuật ngữ “axit hữu cơ” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất axit carboxylic có mạch hydrocacbon thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 1 đến 18 nguyên tử cacbon, ví dụ, axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric và axit pelargonic.

“Dung dịch đệm” được sử dụng để chống lại sự thay đổi về độ pH khi lượng nhỏ axit hoặc kiềm được bổ sung vào. Khả năng của dung dịch đệm là số đo định lượng về tính năng chống lại sự thay đổi về độ pH của dung dịch đệm khi được bổ

sung ion hydroxit. Thuật ngữ “hệ dung dịch đệm” được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm

HCl, Natri xitrat, độ pH = 1 - 5

Axit xitric, Natri xitrat, độ pH = 2,5 - 5,6

Axit axetic, Natri axetat, độ pH = 3,7 - 5,6

NH₄Cl, NH₄OH, độ pH = từ 1 đến 11.

Thuật ngữ “terpen kháng vi sinh vật” được sử dụng trong bản mô tả này có thể là alyl disulfua, xitral, pinen, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, anetol, long não, tinh dầu bạc hà, limonen, farnesol, caroten, thymol, borneol, myrxen, terpenen, linalool, hoặc hỗn hợp của chúng. Các terpen được ưu tiên là alyl disulfua, thymol, xitral, eugenol, carvacrol, và carvon, hoặc hỗn hợp của chúng.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” của hợp chất có nghĩa là lượng có khả năng thực hiện chức năng của hợp chất này hoặc tính chất mà lượng hữu hiệu này được biểu thị, như lượng đủ nhưng không độc để tạo ra tác dụng kháng vi sinh vật. Do đó, lượng hữu hiệu có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách áp dụng các thử nghiệm thông thường.

Các chế phẩm có thể thay đổi không chỉ về nồng độ của các thành phần chính, tức là các axit hữu cơ, mà còn về loại terpen, kiểu chất hoạt động bề mặt và nồng độ nước được sử dụng. Sáng chế có thể được thay đổi bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ terpen và chất hoạt động bề mặt ra khỏi các chế phẩm này.

Thuật ngữ “tác dụng hiệp đồng” hoặc “tính hiệp đồng” có nghĩa là tác dụng bảo quản được cải thiện khi các thành phần này được sử dụng ở dạng hỗn hợp so với tác dụng cộng được mong đợi trên cơ sở từng thành phần được sử dụng riêng rẽ.

Các chế phẩm theo sáng chế chứa các axit hữu cơ có 1 đến 18 nguyên tử cacbon, chứa lượng hữu hiệu của hỗn hợp C₂:C₉ hoặc hỗn hợp C₃:C₉, tạo ra tác dụng bảo quản hiệp đồng. Nói chung, dung dịch nước chứa các axit mạch ngắn được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 5, tốt hơn là từ độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 3, sau đó axit có 9 nguyên tử cacbon (Pelargonic) được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 20% trọng lượng cùng với terpen và chất hoạt động bề mặt và các chất phụ gia tùy ý khác.

Terpen kháng vi sinh vật, chiết xuất thực vật hoặc tinh dầu chứa terpen có thể được sử dụng theo sáng chế cũng như terpen có độ tinh khiết cao hơn. Terpen hiện có bán trên thị trường hoặc có thể được tạo ra theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như chiết bằng dung môi hoặc chiết/chưng cất bằng hơi hoặc tổng hợp theo cách hóa học.

Chất hoạt động bề mặt có thể là chất không ion, cation, hoặc anion. Các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, polysorbat 40, polysorbat 60, este polyglyxeryl, polyglyxeryl monooleat, decaglyxeryl monocaprylat, propylen glycol dicaprilat, triglyxerol monostearat, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, các chất hoạt động bề mặt thu được từ dầu thầu dầu được etoxyl hóa hoặc hỗn hợp của chúng.

Toàn bộ chế phẩm có thể chứa từ 1% đến 100% khối lượng axit hữu cơ, tốt hơn là chứa từ 20% đến 95%. Trong thành phần axit hữu cơ, từ 2% đến 20% trọng lượng là axit pelargonic và từ 98% đến 80% khối lượng còn lại là axit axetic, axit propionic hoặc hỗn hợp của chúng. Chế phẩm này có thể chứa từ 0% đến 20% khối lượng terpen, tốt hơn là từ 0,5% đến 10%, và từ 0% đến 20% trọng lượng chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là chứa từ 0,5% đến 5%. Toàn bộ chế phẩm có thể chứa từ 0% đến 99% khối lượng nước.

Chế phẩm theo sáng chế là hiệu nghiệm đối với tác nhân lây nhiễm bất kỳ trong số các tác nhân có trong nước, thức ăn và các thành phần chính của thức ăn nêu trên, đặc biệt là vi khuẩn, mycoplasma (vi khuẩn ký sinh không có vách tế bào), virus và nấm. Ví dụ về các tác nhân gây nhiễm bệnh này là *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycoplasma iowae*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum graminicola*, *Penicillium* sp., *Mycoplasma pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Clostridia* sp., *Campylobacter* sp. và các chủng khác. Các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế là hiệu nghiệm trong việc ngăn ngừa nhiều, nếu như không phải là tất cả, các loại gây nhiễm bệnh này ở nhiều đối tượng khác nhau, kể cả người, các động vật có vú khác và gia cầm.

Sáng chế bao gồm phương pháp khử trùng nước, thức ăn và thành phần thức ăn. Phương pháp này bao gồm bước dùng chế phẩm theo nhiều cách khác nhau. Ví dụ, các chế phẩm này được phun vào thức ăn, được phun vào nước, được trộn với

nước uống, được phun vào bề mặt nơi tích trữ nước và thức ăn để sử dụng sau hoặc tiêu thụ hàng ngày, được bổ sung nhỏ giọt vào thông qua dụng cụ cấp thuốc chuẩn hoặc thiết bị khử trùng nước, ví dụ, trong các chuồng nuôi gia súc trong giai đoạn bắt đầu, giai đoạn sinh trưởng và giai đoạn kết thúc.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một cách an toàn và có hiệu quả làm chất bảo quản dùng cho nước và thức ăn cho tất cả các loại gia súc được nuôi công nghiệp, để sử dụng cho người và sử dụng bên ngoài, cho động vật cảnh, và các động vật khác mong muốn có nồng độ vi sinh vật thấp trong nguồn nước hoặc thức ăn.

Nhiều tài liệu công bố được trích dẫn trong toàn bộ bản mô tả này. Phần bộc lộ của các tài liệu này được đưa toàn bộ vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Đánh giá các axit hữu cơ được đệm

Mục đích: để xác định tác động của độ pH đến hoạt tính kháng vi sinh vật của axetic và axit propionic

Xử lý:

- 1) Đối chứng (đối chứng âm tính)
- 2) Axit formic : axit propionic (tỷ lệ 90:10; đối chứng dương tính)
- 3) Axit axetic (độ pH=1)
- 4) Axit axetic (độ pH=2)
- 5) Axit axetic (độ pH=3)
- 6) Axit axetic (độ pH=4)
- 7) Axit axetic (độ pH=5)
- 8) Axit axetic (độ pH=6)
- 9) Axit axetic (độ pH=7)
- 10) Axit propionic (độ pH=1)
- 11) Axit propionic (độ pH=2)
- 12) Axit propionic (độ pH=3)
- 13) Axit propionic (độ pH=4)

14) Axit propionic (độ pH=5)

15) Axit propionic (độ pH=6)

16) Axit propionic (độ pH=7)

Quy trình:

Axit propionic và axit axetic được đệm bằng amoni hydroxit đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 7. Hàm lượng axit của dung dịch đã được đệm được xác định bằng cách tính theo tỷ lệ trọng lượng để thu được cùng hàm lượng axit trong các dung dịch thử nghiệm. Các dung dịch được bổ sung vào nước vô trùng đã được khử ion để tạo ra dung dịch axit với nồng độ 0,025%, 0,05%, 0,075% và 0,1%. Độ pH của các dung dịch đã được khử ion được ghi lại và vấn đề bất kỳ liên quan đến độ hòa tan được ghi lại.

100ul dịch nuôi cấy môi trường dinh dưỡng lỏng chứa *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được bổ sung vào từng ống nghiệm pha loãng. Sau khi bổ sung, các ống nghiệm được lắc và để yên. Vào thời điểm 4 giờ và 24 giờ sau khi bổ sung nguyên liệu cấy, 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lập lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm. Liều lượng hữu hiệu tối thiểu của từng axit được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính.

Kết quả:

Bảng 1. Tác dụng của việc đệm độ pH đến hiệu quả của axit axetic đối với *Salmonella*

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Đối chứng	N/A	1505	0	1180	0
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,025	203	87	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,05	50	97	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,075	20	99	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,1	3	100	0	100
Axit axetic, độ pH=1	0,025	883	41	107	91

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Axit axetic, độ pH=1	0,05	750	50	7	99
Axit axetic, độ pH=1	0,075	617	59	17	99
Axit axetic, độ pH=1	0,1	520	65	7	99
Axit axetic, độ pH=2	0,025	920	39	170	86
Axit axetic, độ pH=2	0,05	817	46	50	96
Axit axetic, độ pH=2	0,075	673	55	20	98
Axit axetic, độ pH=2	0,1	670	55	17	99
Axit axetic, độ pH=3	0,025	1100	27	300	75
Axit axetic, độ pH=3	0,05	843	44	117	90
Axit axetic, độ pH=3	0,075	927	38	90	92
Axit axetic, độ pH=3	0,1	873	42	43	96
Axit axetic, độ pH=4	0,025	1067	29	543	54
Axit axetic, độ pH=4	0,05	1167	22	407	66
Axit axetic, độ pH=4	0,075	1097	27	263	78
Axit axetic, độ pH=4	0,1	1167	22	183	84
Axit axetic, độ pH=5	0,025	1267	16	993	16
Axit axetic, độ pH=5	0,05	1533	0	873	26
Axit axetic, độ pH=5	0,075	1367	9	805	32
Axit axetic, độ pH=5	0,1	1300	14	597	49
Axit axetic, độ pH=6	0,025	1500	0	1167	1
Axit axetic, độ pH=6	0,05	1767	0	1400	0
Axit axetic, độ pH=6	0,075	1667	0	1400	0
Axit axetic, độ pH=6	0,1	1633	0	1433	0
Axit axetic, độ pH=7	0,025	1567	0	1300	0
Axit axetic, độ pH=7	0,05	1600	0	1433	0
Axit axetic, độ pH=7	0,075	1467	2	1433	0

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	Salmonella sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Axit axetic, độ pH=7	0,1	1567	0	1500	0

Bảng 2. Tác dụng của việc đệm độ pH đến hiệu quả của axit propionic đối với *Salmonella*

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	Salmonella sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Đối chứng	N/A	1505	0	1180	0
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,025	203	87	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,05	50	97	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,075	20	99	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,1	3	100	0	100
Axit propionic, độ pH=1	0,025	1200	20	133	89
Axit propionic, độ pH=1	0,05	923	39	37	97
Axit propionic, độ pH=1	0,075	530	65	23	98
Axit propionic, độ pH=1	0,1	450	70	10	99
Axit propionic, độ pH=2	0,025	1067	29	70	94
Axit propionic, độ pH=2	0,05	733	51	10	99
Axit propionic, độ pH=2	0,075	477	68	13	99
Axit propionic, độ pH=2	0,1	380	75	7	99
Axit propionic, độ pH=3	0,025	1467	2	190	84
Axit propionic, độ pH=3	0,05	847	44	83	93
Axit propionic, độ pH=3	0,075	973	35	60	95
Axit propionic, độ pH=3	0,1	603	60	27	98
Axit propionic, độ pH=4	0,025	1367	9	615	48
Axit propionic, độ pH=4	0,05	1200	20	293	75

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Axit propionic, độ pH=4	0,075	943	37	187	84
Axit propionic, độ pH=4	0,1	1167	22	163	86
Axit propionic, độ pH=5	0,025	>1505	0	793	33
Axit propionic, độ pH=5	0,05	1400	7	943	20
Axit propionic, độ pH=5	0,075	1167	22	630	47
Axit propionic, độ pH=5	0,1	817	46	557	53
Axit propionic, độ pH=6	0,025	>1505	0	1450	0
Axit propionic, độ pH=6	0,05	1400	7	1067	10
Axit propionic, độ pH=6	0,075	>1505	0	1233	0
Axit propionic, độ pH=6	0,1	1700	0	1333	0
Axit propionic, độ pH=7	0,025	>1505	0	1667	0
Axit propionic, độ pH=7	0,05	1700	0	1367	0
Axit propionic, độ pH=7	0,075	>1505	0	1700	0
Axit propionic, độ pH=7	0,1	1600	0	1367	0

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Xử lý	MIC tại thời điểm 4 giờ	MIC tại thời điểm 24 giờ
Axit formic: axit propioniconic	0,067	<0,025
Axit axetic, độ pH=1	0,129	0,065
Axit axetic, độ pH=2	0,142	0,067
Axit axetic, độ pH=3	0,176	0,073
Axit axetic, độ pH=4	0,207	0,096
Axit axetic, độ pH=5	0,238	0,210
Axit axetic, độ pH=6	ND	ND
Axit axetic, độ pH=7	ND	ND
Axit propionic, độ pH=1	0,131	0,066
Axit propionic, độ pH=2	0,120	0,064

Xử lý	MIC tại thời điểm 4 giờ	MIC tại thời điểm 24 giờ
Axit propionic, độ pH=3	0,149	0,069
Axit propionic, độ pH=4	0,237	0,091
Axit propionic, độ pH=5	0,170	0,165
Axit propionic, độ pH=6	ND	ND
Axit propionic, độ pH=7	ND	ND

ND - nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibition concentration - MIC) không thể xác định được do không có hiệu quả ở mức nồng độ cao nhất.

Kết luận: việc đệm axit axetic hoặc axit propionic bằng amoniac làm giảm hiệu quả của sản phẩm đối với *Salmonella*. Điểm thay đổi đường như ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 4.

Ví dụ 2 - Đánh giá từng axit hữu cơ

Mục đích: để xác định tác động của chiều dài mạch cacbon của các axit hữu cơ đến hoạt tính kháng vi sinh vật

Xử lý:

- 1) Đối chứng
- 2) Axit formic : axit propionic (tỷ lệ 90:10; đối chứng dương tính)
- 3) Axit formic
- 4) Axit axetic
- 5) Axit propionic
- 6) Axit butyric
- 7) Axit valeric
- 8) Axit caproic
- 9) Axit oenanthic
- 10) Axit caprylic
- 11) Axit pelargonic
- 12) Axit lauric
- 13) Kali hydroxit

Quy trình:

Thử nghiệm này đánh giá tác dụng của axit béo tự do. Một vài axit béo mạch dài (caprylic, pelargonic và lauric) không hòa tan trong nước và KOH được sử dụng để đưa các axit này vào trong dung dịch nước (dung dịch cuối cùng chứa trọng lượng tương đương của axit và KOH. Hàm lượng axit của các dung dịch được xác định bằng cách tính theo tỷ lệ khối lượng (lượng axit/tổng trọng lượng của dung dịch đậm)). Các dung dịch được bổ sung vào nước vô trùng đã được khử ion để tạo ra các dung dịch axit có nồng độ 0,025%, 0,05%, 0,075% và 0,1%. Độ pH của các dung dịch đã được khử ion được ghi lại và vấn đề bất kỳ liên quan đến độ hòa tan được ghi lại.

100ul dịch nuôi cấy môi trường dinh dưỡng lỏng chứa *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được bổ sung vào từng ống nghiệm pha loãng. Sau khi bổ sung, các ống nghiệm được lắc và để yên. Tại thời điểm 4 giờ và 24 giờ sau khi bổ sung nguyên liệu cấy, 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa (lập lại 3 đĩa). Các đĩa này được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm. Liều lượng hữu hiệu tối thiểu của từng axit được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính.

Bảng 4. Tác dụng của các axit hữu cơ đối với *Salmonella*

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Đối chứng		1600	0	1700	0
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,025	160	90	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,05	20	99	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,075	0	100	0	100
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,1	0	100	0	100
Axit formic	0,025	83	95	0	100
Axit formic	0,05	7	100	0	100
Axit formic	0,075	0	100	0	100
Axit formic	0,1	0	100	0	100
Axit axetic	0,025	917	43	80	95
Axit axetic	0,05	840	48	13	99

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Axit axetic	0,075	677	58	10	99
Axit axetic	0,1	513	68	15	99
Axit propionic	0,025	1167	27	170	90
Axit propionic	0,05	900	44	40	98
Axit propionic	0,075	877	45	25	99
Axit propionic	0,1	773	52	30	98
Axit butyric	0,025	1060	34	170	90
Axit butyric	0,05	833	48	57	97
Axit butyric	0,075	977	39	30	98
Axit butyric	0,1	547	66	10	99
Axit valeric	0,025	1233	23	533	69
Axit valeric	0,05	1267	21	73	96
Axit valeric	0,075	990	38	37	98
Axit valeric	0,1	657	59	17	99
Axit caproic	0,025	1267	21	30	98
Axit caproic	0,05	1433	10	7	100
Axit caproic	0,075	523	67	0	100
Axit caproic	0,1	27	98	0	100
Axit oenanthic	0,025	1103	31	10	99
Axit oenanthic	0,05	0	100	0	100
Axit oenanthic	0,075	0	100	0	100
Axit oenanthic	0,1	0	100	0	100
Axit caprylic / KOH	0,025	1567	2	1400	18
Axit caprylic / KOH	0,05	1333	17	797	53
Axit caprylic / KOH	0,075	1100	31	77	95
Axit caprylic / KOH	0,1	0	100	0	100
Axit pelargonic / KOH	0,025	7	100	0	100

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Axit pelargonic / KOH	0,05	0	100	0	100
Axit pelargonic / KOH	0,075	0	100	0	100
Axit pelargonic / KOH	0,1	0	100	0	100
Axit lauric / KOH	0,025	670	58	20	99
Axit lauric / KOH	0,05	0	100	0	100
Axit lauric / KOH	0,075	0	100	0	100
Axit lauric / KOH	0,1	0	100	0	100
KOH	0,025	0	100	0	100
KOH	0,05	0	100	0	100
KOH	0,075	0	100	0	100
KOH	0,1	0	100	0	100

Bảng 5. Nồng độ ức chế tối thiểu của các axit hữu cơ đối với *Salmonella*

Xử lý	MIC tại thời điểm 4 giờ	MIC tại thời điểm 24 giờ
Axit formic: axit propionic	0,065	<0,025
Axit formic	0,064	<0,025
Axit axetic	0,129	0,064
Axit propionic	0,166	0,066
Axit butyric	0,142	0,066
Axit valeric	0,174	0,070
Axit caproic	0,103	0,063
Axit oenanthic	0,075	0,063
Axit caprylic	0,109	0,090
Axit pelargonic	0,063	<0,025
Axit lauric	0,072	<0,025
Kali hydroxit	<0,025	<0,025

Kết luận: Không quan sát được mối liên quan trực tiếp nào giữa hiệu quả đối với *Salmonella* và chiều dài mạch của axit hữu cơ. Điều này là trái với hiệu quả đã được thông báo đối với mối liên quan giữa chiều dài mạch axit và tác dụng chống nấm. Hoạt tính của axit caprylic, pelargonic và lauric không thể so sánh được với các axit có mạch ngắn hơn do việc sử dụng KOH.

Ví dụ 3 – Các hỗn hợp axit hữu cơ được đệm

Mục đích: Trong số các axit hữu cơ mạch dài, quan sát thấy pelargonic có hiệu quả cao nhất trên cơ sở các nghiên cứu trước đây. Thử nghiệm này nhằm xác định liệu có tác dụng hiệp đồng hay không khi axit propionic hoặc axit axetic đã được đệm được kết hợp với axit pelargonic.

Các sản phẩm thử nghiệm:

- 1) Đối chứng
- 2) Axit formic : axit propionic (tỷ lệ 90:10; đối chứng dương tính)
- 3) Axit axetic
- 4) Axit axetic: axit pelargonic (80:20: trọng lượng)
- 5) Axit axetic: axit pelargonic (60:40: trọng lượng)
- 6) Axit axetic: axit pelargonic (40:60: trọng lượng)
- 7) Axit axetic: axit pelargonic (20:80: trọng lượng)
- 8) Axit propionic
- 9) Axit propionic: axit pelargonic (80:20: trọng lượng)
- 10) Axit propionic: axit pelargonic (60:40: trọng lượng)
- 11) Axit propionic: axit pelargonic (40:60: trọng lượng)
- 12) Axit propionic: axit pelargonic (20:80: trọng lượng)
- 13) Axit pelargonic

Quy trình: Axit propionic và axit axetic được đệm bằng amoni hydroxit đến độ pH=3 và được kết hợp với axit pelargonic theo các tỷ lệ nêu trên. Hàm lượng axit của dung dịch đã được đệm được xác định bằng cách tính tỷ lệ theo trọng lượng (lượng axit/tổng trọng lượng của dung dịch đệm) và được điều chỉnh để tạo ra độ axit ngang bằng đối với mỗi thử nghiệm. Các dung dịch xử lý nêu trên được bổ sung vào nước vô trùng đã được khử ion để tạo ra tổng nồng độ axit 0,025%,

0,05%, 0,075% và 0,1% đối với các dung dịch. Độ pH của các dung dịch đã được khử ion được ghi lại và vấn đề bất kỳ liên quan đến độ hòa tan được ghi lại.

100ul dịch nuôi cấy môi trường dinh dưỡng lỏng chứa *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được bổ sung vào từng ống nghiệm pha loãng. Sau khi bổ sung, các ống nghiệm được lắc và để yên. Tại thời điểm 4 giờ và 24 giờ sau khi bổ sung nguyên liệu cấy, 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lặp lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm. Liều lượng hữu hiệu tối thiểu của từng axit được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính.

Bảng 6. Tác động của axit pelargonic đến hiệu quả của axetic hoặc propionic đối với *Salmonella*

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	Salmonella sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
Đối chứng	N/A	1517	0	1344	0
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,025	200	87	0	100
	0,05	67	96	0	100
	0,075	20	99	2	100
	0,1	10	99	0	100
100% axit propionic, độ pH=3	0,025	1133	25	70	95
	0,05	880	42	17	99
	0,075	1133	25	20	99
	0,1	857	44	13	99
80% axit propionic, độ pH=3: 20% axit pelargonic	0,025	0	100	3	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
60% axit propionic, độ pH=3: 40% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	Salmonella sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
40% axit propionic, độ pH=3: 60% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
20% axit propionic, độ pH=3: 80% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
100% axetic, độ pH=3	0,025	943	38	123	92
	0,05	1007	34	120	92
	0,075	1007	34	77	95
	0,1	967	36	83	95
80% axetic, độ pH=3: 20% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
60% axetic, độ pH=3: 40% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		cfu/g	% giảm	cfu/g	% giảm
40% axetic, độ pH=3: 60% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	3	100
	0,1	0	100	0	100
20% axetic, độ pH=3: 80% axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	0	100
	0,1	0	100	0	100
axit pelargonic	0,025	0	100	0	100
	0,05	0	100	0	100
	0,075	0	100	0	100
	0,1	0	100	0	100

Bảng 7. Nồng độ ức chế tối thiểu của pelargonic khi được trộn với axetic hoặc axit propionic

Xử lý	MIC tại thời điểm 4 giờ	MIC tại thời điểm 24 giờ
Axit formic: axit propionic	0,067	<0,025
Axit propionic	0,179	0,064
Axit propionic: axit pelargonic (80:20)	<0,025	0,063
Axit propionic: axit pelargonic (60:40)	<0,025	<0,025
Axit propionic: axit pelargonic (40:60)	<0,025	<0,025
Axit propionic: axit pelargonic	<0,025	<0,025

(20:80)		
Axit axetic	0,171	0,068
Axit axetic: axit pelargonic (80:20)	<0,025	<0,025
Axit axetic: axit pelargonic (60:40)	<0,025	<0,025
Axit axetic: axit pelargonic (40:60)	<0,025	<0,025
Axit axetic: axit pelargonic (20:80)	<0,025	<0,025
Axit pelargonic	<0,025	<0,025

Kết luận: việc bổ sung axit pelargonic vào axit propionic hoặc axit axetic làm tăng hiệu quả.

Ví dụ 4:

Axit propionic và axit axetic được đệm bằng amoni hydroxit đến độ pH= 3 và được kết hợp với axit pelargonic theo các tỷ lệ nêu trên. Hàm lượng axit của dung dịch đã được đệm được xác định bằng cách tính tỷ lệ theo trọng lượng (lượng axit/tổng trọng lượng của dung dịch đệm) và được điều chỉnh để tạo ra độ axit ngang bằng đối với mỗi thử nghiệm. Các dung dịch xử lý nêu trên được bổ sung vào nước vô trùng đã được khử ion để tạo ra các dung dịch có tổng nồng độ axit 0,025% và 0,05%. Độ pH của các dung dịch đã được khử ion được ghi lại và vấn đề bất kỳ liên quan đến độ hòa tan được ghi lại.

100ul dịch nuôi cấy môi trường dinh dưỡng lỏng chứa *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được bổ sung vào từng ống nghiệm pha loãng. Sau khi bổ sung, các ống nghiệm được lắc và để yên. Tại thời điểm 4 giờ và 24 giờ sau khi bổ sung nguyên liệu cấy, 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lặp lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm.

Bảng 8. Tác động của axit pelargonic đến hiệu quả của axetic hoặc propionic đối với *Salmonella*

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		(cfu/g)	% giảm	(cfu/g)	% giảm
Axit formic: axit propionic (90:10)	0,025	600	57	<10	100

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	Salmonella sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		(cfu/g)	% giảm	(cfu/g)	% giảm
	0,05	170	88	<10	100
100% axit propionic, độ pH=3	0,025	990	29	130	91
	0,05	1000	29	50	96
99% axit propionic, độ pH=3: 1% axit pelargonic	0,025	1100	21	100	93
	0,05	620	56	<10	100
98% axit propionic, độ pH=3: 2% Axit pelargonic	0,025	1100	21	60	96
	0,05	560	60	<10	100
95% axit propionic, độ pH=3: 5% axit pelargonic	0,025	780	44	<10	100
	0,05	50	96	<10	100
90% axit propionic, độ pH=3: 10% axit pelargonic	0,025	220	84	<10	100
	0,05	<10	100	<10	100
80% axit propionic, độ pH=3: 20% axit pelargonic	0,025	<10	100	<10	100
	0,05	<10	100	<10	100
100% axetic, độ pH=3	0,025	1000	29	60	96
	0,05	950	32	20	99
99% axetic, độ pH=3: 1% axit pelargonic	0,025	1200	14	90	94
	0,05	820	41	<10	100
98% axetic, độ pH=3: 2% axit pelargonic	0,025	1100	21	40	97
	0,05	710	49	<10	100
95% axetic, độ pH=3: 5% axit pe-	0,025	690	51	<10	100

Sản phẩm thử nghiệm	Nồng độ sản phẩm	<i>Salmonella</i> sau các khoảng thời gian			
		4 giờ		24 giờ	
		(cfu/g)	% giảm	(cfu/g)	% giảm
largonic					
	0,05	40	97	<10	100
90% axetic, độ pH=3: 10% axit pelargonic	0,025	280	80	<10	100
	0,05	<10	100	<10	100
80% axetic, độ pH=3: 20% axit pelargonic	0,025	<10	100	<10	100
	0,05	<10	100	<10	100
Đối chứng		1400		1400	

Kết luận: việc bổ sung axit pelargonic (từ 1 đến 20%) vào propionic hoặc axit axetic làm tăng hiệu quả đối với *Salmonella*.

Ví dụ 5:

Các axit propionic, axetic và pelargonic riêng rẽ hoặc kết hợp như nêu trên được bổ sung vào nước vô trùng đã được khử ion để tạo ra các dung dịch có tổng nồng độ axit 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% và 0,01%. Độ pH của các dung dịch đã được khử ion được ghi lại và vấn đề bất kỳ liên quan đến độ hòa tan được ghi lại.

100ul dịch nuôi cấy môi trường dinh dưỡng lỏng chứa *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được bổ sung vào từng ống nghiệm pha loãng. Sau khi bổ sung, các ống nghiệm được lắc và để yên. Tại thời điểm 24 giờ sau khi bổ sung nguyên liệu cấy, 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lặp lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm.

Bảng 9. Tác động của axit pelargonic đến hiệu quả của axetic hoặc propionic đối với *Salmonella*

	<i>Salmonella</i> 24 giờ sau khi xử lý (cfu/g)				
Sản phẩm thử nghiệm (%)	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
Axit formic: axit propionic (90:10)	0	10	20	60	500
Axit pelargonic	850	1500	UD	1300	1400
Axit propionic	560	910	810	870	1200
Axit axetic	1100	1100	UD	1100	UD
Axit propionic/Axit pelargonic (95/5)	0	30	240	360	1400
Axit axetic/Axit pelargonic (95/5)	20	130	UD	940	1100
Đối chứng	1400				

UD = Không thể xác định được

Kết luận: Thử nghiệm này cho thấy tác dụng hiệp đồng tăng bằng cách trộn axit propionic/axit pelargonic (theo tỷ lệ 95/5) và axetic/pelargonic (theo tỷ lệ 95/5) 24 giờ sau khi xử lý.

Ví dụ 6

Axit capric (5%, 10% hoặc 20%) đã pha loãng trong axit axetic hoặc axit propionic được thử nghiệm để xác định hiệu quả của nó đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Thức ăn công nghiệp cho gia cầm có bổ sung *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được xử lý bằng các dung dịch sau ở nồng độ 1 hoặc 3kg/triệu tấn. Hai mươi tư giờ sau khi xử lý, 10g thức ăn được bổ sung vào 90ml dung dịch đệm Butterfield, được trộn và sau đó 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lặp lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm.

Bảng 10. Tác dụng của axit capric/axit axetic đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Xử lý	cfu/g	% Giảm
Đối chứng	5733	
Formic:Axetic (1kg/tấn)	17	99,7

Axit axetic (1kg/tấn)	3367	41,3
Axit axetic (3kg/tấn)	2600	54,6
5% axit capric trong axit axetic (1kg/tấn)	3200	44,2
5% axit capric trong axit axetic (3kg/tấn)	3733	34,9
10% axit capric trong axit axetic (1kg/tấn)	3233	43,6
10% axit capric trong axit axetic (3kg/tấn)	2900	49,4
20% axit capric trong axit axetic (1kg/tấn)	3200	44,2
20% axit capric trong axit axetic (3kg/tấn)	4500	21,5

Bảng 11. Tác dụng của axit capric/axit propionic đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Xử lý	cfu/g	% Giảm
Đối chứng	4500	
Axit formic: axit propionic 1kg/tấn	4100	8,9
Axit formic: axit propionic 3kg/tấn	2067	54,1
Axit Propionic 1kg/tấn	4633	0
Axit Propionic 3kg/tấn	5633	0
5% axit capric trong axit propionic 1kg/tấn	3233	28,2
5% axit capric trong axit propionic 3kg/tấn	3400	24,4
10% axit capric trong axit propionic 1kg/tấn	2367	47,4
10% axit capric trong axit propionic 3kg/tấn	4033	10,4
20% axit capric trong axit propionic 1kg/tấn	4067	9,6
20% axit capric trong axit propionic 3kg/tấn	3700	17,8

Việc bổ sung axit capric vào axetic hoặc axit propionic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 20% dường như không cải thiện một cách đáng kể hiệu quả của axit hữu cơ đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Ví dụ 7:

Axit myristic (5%, 10% và 20%) được pha loãng trong axit propionic được thử nghiệm để xác định hiệu quả của nó đối với *Salmonella* trong thức ăn. Axit myristic là không hòa tan trong axit axetic.

Thức ăn công nghiệp cho gia cầm có bổ sung *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được xử lý bằng các dung dịch sau ở nồng độ 1 hoặc 3kg/triệu tấn. Hai mươi tư giờ sau khi xử lý, 10g thức ăn được bổ sung vào 90ml dung dịch đệm Butterfield, được trộn và sau đó 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lập lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm.

Bảng 12. Tác dụng của axit myristic/axit propionic đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Xử lý	cfu/g	% Giảm
Đối chứng	40000	-
Axit formic: axit propionic 1kg/triệu tấn	23533	41,17
Axit formic: axit propionic 3kg/triệu tấn	7167	82,08
Axit propionic 1kg/triệu tấn	3967	90,08
Axit propionic 3kg/triệu tấn	233	99,42
5% axit myristic trong axit propionic 1kg/triệu tấn	7767	80,58
5% axit myristic trong axit propionic 3kg/triệu tấn	1500	69,25
10% axit myristic trong axit propionic 1kg/triệu tấn	22567	43,58
10% axit myristic trong axit propionic 3kg/triệu tấn	23333	41,67
20% axit myristic trong axit propionic 1kg/triệu tấn	22667	43,33
20% axit myristic trong axit propionic 3kg/triệu tấn	22967	42,58

Không quan sát được tác dụng có lợi nào về mặt hiệu quả khi axit myristic được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 20% vào axit propionic so với hỗn hợp axit propionic chuẩn.

Ví dụ 8:

Axit lauric (5%, 10%, 20%) được pha loãng bằng axit propionic được thử nghiệm để xác định hiệu quả của nó đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Thức ăn công nghiệp cho gia cầm có bổ sung *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) được xử lý bằng các dung dịch sau ở nồng độ 1 hoặc 2 kg/triệu tấn. Hai mươi tư giờ sau khi xử lý, 10g thức ăn được bổ sung vào 90ml dung dịch đệm

Butterfield, được trộn và sau đó 100ul dung dịch này được dàn trên aga trong đĩa chuẩn (Standard Plate) (lặp lại 3 đĩa). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi đếm.

Bảng 13. Tác dụng của axit lauric/axit propionic đối với *Salmonella* trong thức ăn.

Xử lý	cfu/g	% Giảm
Đối chứng	33333	-
Axit formic: axit propionic 1kg/triệu tấn	24633	26,1
Axit formic: axit propionic 3kg/triệu tấn	10500	68,5
Axit propionic 1kg/triệu tấn	2567	92,3
Axit propionic 3kg/triệu tấn	0	100,0
5% axit lauric trong axit propionic 1kg/triệu tấn	8767	73,7
5% axit lauric trong axit propionic 3kg/triệu tấn	433	98,7
10% axit lauric trong axit propionic 1kg/triệu tấn	7800	76,6
10% axit lauric trong axit propionic 3kg/triệu tấn	833	97,5
20% axit lauric trong axit propionic 1kg/triệu tấn	9100	72,7
20% axit lauric trong axit propionic 3kg/triệu tấn	2333	93,0

Không quan sát được tác dụng có lợi nào khi axit lauric được bổ sung (ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 20%) vào axit propionic so với hỗn hợp axit propionic chuẩn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng có thể thực hiện nhiều thay đổi và biến đổi đối với sáng chế mà không vượt quá phạm vi của nó. Cần phải hiểu rằng bản mô tả và các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa, trong khi phạm vi thực và ý tưởng của sáng chế được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm kháng vi sinh vật để kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn để dùng cho động vật, chứa:
 - từ 1% đến 99% khối lượng các axit hữu cơ trong dung dịch nước, là dạng hỗn hợp gồm các axit hữu cơ có 2 nguyên tử cacbon và các axit hữu cơ có 9 nguyên tử cacbon hoặc hỗn hợp gồm các axit hữu cơ có 3 nguyên tử cacbon và các axit hữu cơ có 9 nguyên tử cacbon, được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 5;
 - từ 0% đến 20% khối lượng terpen; và
 - từ 0,5% đến 10% chất hoạt động bề mặt;
 trong đó nồng độ axit có 9 nguyên tử cacbon là axit pelargonic, với nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 20% tổng lượng axit hữu cơ.
2. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 3.
3. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 20, polysorbat 80, polysorbat 40, polysorbat 60, este polyglyxeryl, polyglyxeryl monooleat, decaglyxeryl monocaprylat, propylen glycol dicaprilat, triglyxerol monostearat, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, các chất hoạt động bề mặt thu được từ dầu thầu dầu được etoxyl hóa hoặc hỗn hợp của chúng.
4. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó nồng độ chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5% khối lượng.
5. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó terpen được chọn từ nhóm bao gồm alyl đisulfua, xitral, pinen, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, anetol, camphor, menthol, limonen, farnesol, caroten, thymol, borneol, myrxen, terpenen, linalool, hoặc hỗn hợp của chúng.

6. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó terpen được chọn từ nhóm bao gồm alyl disulfua, thymol, xitral, eugenol, carvacrol, và carvon, hoặc hỗn hợp của chúng.
7. Chế phẩm kháng vi sinh vật theo điểm 1, trong đó hàm lượng terpen nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% khối lượng.
8. Phương pháp kéo dài thời gian sử dụng nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn để dùng cho động vật, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - xử lý bằng cách phun hoặc trộn vào nước, thức ăn hoặc thành phần thức ăn, lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa 1% đến 99% khối lượng các axit hữu cơ trong dung dịch nước, là dạng hỗn hợp gồm các axit hữu cơ có 2 nguyên tử cacbon và các axit hữu cơ có 9 nguyên tử cacbon hoặc hỗn hợp gồm các axit hữu cơ có 3 nguyên tử cacbon và các axit hữu cơ có 9 nguyên tử cacbon, được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 5;
 - từ 0% đến 20% khối lượng terpen, và
 - từ 0,5% đến 10% chất hoạt động bề mặt;
 - trong đó axit có 9 nguyên tử cacbon là axit pelargonic với nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 20% tổng lượng axit hữu cơ.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm này được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 3.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 20, polysorbat 80, polysorbat 40, polysorbat 60, este polyglyxeryl, polyglyxeryl monooleat, decaglyxeryl monocaprylat, propylen glycol đicaprilat, triglyxerol monostearat, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, các chất hoạt động bề mặt thu được từ dầu thầu dầu được etoxyl hóa hoặc hỗn hợp của chúng.

11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó nồng độ chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5% khối lượng.
12. Phương pháp theo điểm 8, trong đó terpen được chọn từ nhóm bao gồm alyl disulfua, xitral, pinen, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvon, anetol, camphor, menthol, limonen, farnesol, caroten, thymol, borneol, myrxen, terpenen, linalool, hoặc hỗn hợp của chúng.
13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó terpen được chọn từ nhóm bao gồm alyl disulfua, thymol, xitral, eugenol, carvacrol, và carvon, hoặc hỗn hợp của chúng.
14. Phương pháp theo điểm 8, trong đó hàm lượng terpen nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% khối lượng.