



(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)



1-0024366

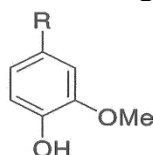
(51)⁷ C12Q 1/04

(13) B

- (21) 1-2012-00115 (22) 15/06/2010
(86) PCT/JP2010/003956 15/06/2010 (87) WO2010/146830 23/12/2010
(30) 2009-142242 15/06/2009 JP; 2009-222796 28/09/2009 JP
(45) 27/07/2020 388 (43) 27/08/2012 293A
(73) ASAHI SOFT DRINKS CO., LTD. (JP)
23-1, Azumabashi 1-chome, Sumida-ku Tokyo 130-8602, Japan
(72) MURAKAMI, Hiroaki (JP); TAKASE, Masanori (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VI KHUẨN TẠO RA GUAIACOL

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm bao gồm các bước: nuôi cấy mẫu xét nghiệm hoặc dịch pha loãng của chúng trên đĩa chứa môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ura axit có chứa hợp chất có công thức sau:



trong đó R là -H, -OH, -C(O)H, -C(O)CH₃, -COOH, C₁-C₃ alkyl hoặc C₁-C₃ alkenyl, trong đó alkyl và alkenyl tùy ý có thể được thế bằng -OH, -C(O)H hoặc -COOH); và phát hiện khuẩn lạc được tạo ra trên môi trường rắn này. Sáng chế cũng đề xuất môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ura axit và bộ kit phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm. Theo sáng chế, vi khuẩn tạo ra guaiacol có mặt trong mẫu xét nghiệm như các nguyên liệu thô của nước ép quả có thể được phát hiện nhanh chóng theo cách đơn giản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và bộ kit để phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong các nguyên liệu thô của nước ép quả.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng các nguyên liệu thô của nước ép quả được chế biến thành đồ uống nước ép quả và thực phẩm được chế biến từ nước ép quả có thể chứa vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt (thermotolerant acidophilic bacteria - TAB) là loại có thể tồn tại trong đồ uống có tính axit thông thường mặc dù các thực phẩm này đã được khử trùng bằng nhiệt. Trong số các vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt điển hình, vi khuẩn thuộc chi *Alicyclobacillus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT) và *Alicyclobacillus acidiphilus* (AAP) được biết là vi khuẩn tạo ra guaiacol (dưới đây được gọi là vi khuẩn tạo ra guaiacol). Cụ thể, vi khuẩn AAT được báo cáo là tạo ra guaiacol bằng cách sử dụng vanilin và axit vanilic (Japan Fruit Juice Association Newsletter (*KAJU KYOKAI HO*), tháng 12 năm 2005, các trang từ 1 đến 15; tài liệu phi sáng chế 2). Guaiacol không độc, nhưng có mùi bất thường. Do đó, các sản phẩm như đồ uống chứa vi khuẩn tạo ra guaiacol sẽ có hương vị bị biến đổi đáng kể. Trong nhiều trường hợp, AAT trong các nguyên liệu thô của nước ép quả được xác định là nguyên nhân chủ yếu. Do đó, rất quan trọng là phải kiểm tra sự có mặt của vi khuẩn tạo ra guaiacol trong các nguyên liệu thô của nước ép quả và các sản phẩm nước ép quả để kiểm soát chất lượng của các nguyên liệu thô và các sản phẩm.

Đã biết rằng, AAT có thể được phát hiện bằng phương pháp bao gồm các bước: bổ sung đồ uống nước ép quả vào môi trường lỏng chứa vanilin, ủ hỗn hợp này và đánh giá mùi của guaiacol bằng cách kiểm tra trực quan (đơn sáng chế Nhật Bản số H7-123998; tài liệu sáng chế 1); hoặc bằng phương pháp phát hiện sự có mặt vi khuẩn tạo ra guaiacol bao gồm bước ủ dung dịch chứa mẫu xét nghiệm với sự có mặt axit vanilic và xử lý guaiacol tạo thành bằng peroxidaza để tạo màu sau đó phân tích định lượng định tính hoặc quang phổ bằng cách sử dụng thiết bị chuyên dụng (đơn sáng chế Nhật Bản số 2004-201668; tài liệu sáng chế 2); hoặc bằng cách phát hiện bằng phương pháp PCR sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với gen mã hóa enzym tạo ra guaiacol (đơn sáng chế Nhật Bản số 2003-000259; tài liệu sáng chế 3).

Kỹ thuật được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 2 nêu trên được sử dụng rộng rãi để phát hiện AAT bằng thử nghiệm gián tiếp đối với sự có mặt của AAT bao gồm các bước

nuôi cấy mẫu trong môi trường lỏng chứa axit vanilic và phát hiện guaiacol được tạo ra bằng phương pháp peroxidaza.

Tuy nhiên, phương pháp peroxidaza là quy trình phức tạp và cần thời gian dài để thu được kết quả do cần phải có bước nuôi cấy trước thích hợp để AAT sinh trưởng trong môi trường lỏng. Ví dụ, để phát hiện số lượng AAT trong mẫu xét nghiệm, cần tạo ra các khuẩn lạc trên môi trường đĩa, chọn nhiều hơn một khuẩn lạc và nuôi cấy các khuẩn lạc tương ứng trong môi trường lỏng, đây là quy trình phức tạp và cần thời gian từ 4 đến 6 ngày.

Ngoài ra, trong phương pháp peroxidaza, sự có mặt hay không có mặt AAT được xác định dựa vào màu nâu nhạt tạo thành do guaiacol biến đổi thành tetraguaiacol do tác động của peroxidaza; do đó, việc xác định có thể rất khó khăn khi mẫu là nguyên liệu thô hoặc môi trường có màu tương tự như nước cam ép. Người thực hiện việc đánh giá trực quan yêu cầu phải có kỹ năng nhất định, do màu bị ảnh hưởng bởi các nhiễu nguyên liệu thô khác nhau và điều kiện hấp khử trùng môi trường. Để xác định chính xác, cần phải phân tích quang phổ với đường cong hiệu chuẩn cho mỗi mẫu xét nghiệm và môi trường hoặc phân tích GC-MS, vì thế yêu cầu phải có máy phân tích đắt tiền và quy trình phức tạp.

Một phương pháp đã biết khác sử dụng môi trường rắn là phương pháp nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, trong đó vi khuẩn tạo ra guaiacol được phân biệt với vi khuẩn không tạo ra guaiacol dựa trên nhiệt độ nuôi cấy. Ví dụ, mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, nhiệt độ này thấp hơn nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của AAT (từ 40°C đến 50°C), và sự có mặt hay không có mặt khuẩn lạc được xác định. Do sự sinh trưởng của AAT cũng bị giảm xuống khi nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, nên độ nhạy phát hiện đối với AAT là thấp và vi khuẩn không tạo ra guaiacol không mong muốn có khoảng nhiệt độ sinh trưởng tối ưu thấp hơn cũng sẽ xuất hiện. Do đó, bước nuôi cấy trước được yêu cầu trong phương pháp nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C để cải thiện độ nhạy phát hiện AAT. Trong trường hợp này, tất cả các bước có thể mất thời gian dài từ 8 đến 10 ngày và khả năng chọn là không đủ. Hơn nữa, phương pháp này không định lượng được do cần có bước nuôi cấy trước.

Ngoài ra, đã biết rằng các thành phần như polyphenol được chứa trong cam quýt và nho có thể ức chế sự sinh trưởng của AAT. Do đó, mẫu xét nghiệm cần được pha loãng thích hợp trước khi tiến hành thử nghiệm trên các nguyên liệu thô có nồng độ nước hoa quả cao như 100% nước ép quả. Ví dụ, nước cam ép phải được pha loãng đến

nồng độ 1% trước khi thử nghiệm. Tuy nhiên, yếu tố pha loãng cần phải được xem xét đối với từng loại nước ép quả và khu vực sản xuất nó, khiến cho quy trình thử nghiệm nêu trên phức tạp hơn.

Do đó, vẫn cần có phương pháp xác định nhanh và chính xác sự có mặt hay không có mặt vi khuẩn tạo ra guaiacol trong các nguyên liệu thô của nước ép quả mà không yêu cầu quy trình phức tạp, thiết bị đắt tiền hoặc kỹ năng của người vận hành. Cũng cần có phương pháp thuận tiện cho phép thử nghiệm tại nơi sản xuất hoa quả và trong các cơ sở sản xuất nguyên liệu thô của nước ép quả.

Sau đây là các tài liệu viện dẫn trong sáng chế. Nội dung của các tài liệu được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Tài liệu sáng chế 1: Đơn sáng chế Nhật Bản số H7-123998

Tài liệu sáng chế 2: Đơn sáng chế Nhật Bản số 2004-201668

Tài liệu sáng chế 3: Đơn sáng chế Nhật Bản số 2003-000259

Tài liệu phi sáng chế 1: "The Unified Test Method for Thermo-Acidophilic Bacilli", Japan Fruit Juice Association, 2005, trang 25.

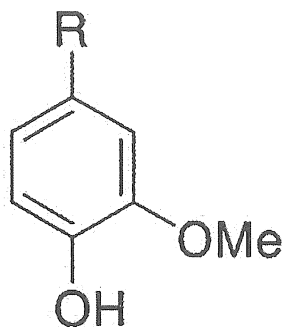
Tài liệu phi sáng chế 2: Japan Fruit Juice Association Newsletter (*KAJU KYOKAI HO*), tháng 12 năm 2005, các trang từ 1 đến 15.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện nhanh và đơn giản vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm như các nguyên liệu thô của nước ép quả.

Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng, vi khuẩn tạo ra guaiacol có thể sinh trưởng chọn lọc và tạo thành khuẩn lạc trên môi trường rắn chứa hợp chất có khung metoxyphenol ở khoảng nồng độ cụ thể. Việc phát hiện sự tạo thành khuẩn lạc trên môi trường rắn cho phép thuận tiện phát hiện sự có mặt hay không có mặt vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu kiểm tra và đếm số lượng khuẩn lạc cho phép thuận tiện xác định số lượng vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu kiểm tra.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm, bao gồm bước nuôi cấy mẫu xét nghiệm hoặc dịch pha loãng trên môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa một hoặc nhiều hợp chất có công thức sau:



trong đó R là -H, -OH, -C(O)H, -C(O)CH₃, -COOH, C₁-C₃ alkyl hoặc C₁-C₃ alkenyl, trong đó alkyl và alkenyl tùy ý có thể được thế bằng -OH, -C(O)H hoặc -COOH); và phát hiện khuẩn lạc được tạo ra trên môi trường rắn. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp cho phép phát hiện và định lượng trực tiếp vi khuẩn tạo ra guaiacol mà không yêu cầu bước nuôi cấy trước hoặc bước xử lý để phân tích định tính (tạo màu bằng phương pháp peroxidaza) được yêu cầu trong các phương pháp thông thường. Tốt hơn nếu hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm vanilin, axit vanilic, axit ferulic, guaiacol, 4-hydroxy-3-metoxyphenylacrylaldehyt, axit 4-hydroxy-3-metoxyphenyl propionic, rượu 4-hydroxy-3-metoxyphenylmetylic, metoxyhydroquinon, 4-hydroxy-3-metoxyphenyl axetaldehyt và 4-vinylguaiacol. Hợp chất này tốt hơn nữa là vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic.

Đặc biệt tốt hơn là, môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa axit vanilic với lượng lớn hơn hoặc bằng 50ppm, vanilin với lượng lớn hơn hoặc bằng 500ppm hoặc axit ferulic với lượng lớn hơn hoặc bằng 25ppm. Tốt hơn nữa là, môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa axit vanilic với lượng nằm trong khoảng từ 50ppm đến 225ppm, tốt hơn nữa là từ 50ppm đến 75ppm. Tốt hơn là, việc nuôi cấy trên đĩa được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 55°C, tốt hơn là từ 30°C đến 45°C, đặc biệt tốt là 30°C (từ 27°C đến 33°C). Trong sáng chế, có thể dự kiến rằng nhiệt độ có sự sai khác $\pm 10\%$ có thể cho hiệu quả tương tự.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm chứa môi trường rắn đã khử trùng dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa hợp chất có khung metoxyphenol, cụ thể là vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất môi trường chọn lọc dùng cho vi khuẩn tạo ra guaiacol bao gồm môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa hợp chất có khung metoxyphenol, cụ thể là bất kỳ trong số vanilin, axit vanilic và axit ferulic.

Theo sáng chế, vi khuẩn tạo ra guaiacol trong các mẫu xét nghiệm như các nguyên liệu thô của nước ép quả có thể được phát hiện nhanh chóng theo cách đơn giản.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol theo sáng chế bao gồm các bước: nuôi cấy mẫu xét nghiệm hoặc dịch pha loãng của chúng trên đĩa chứa môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa hợp chất có khung metoxyphenol, tốt hơn là vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic và phát hiện khuẩn lạc được tạo thành trên đĩa. Vi khuẩn tạo ra guaiacol tạo ra guaiacol bằng cách sử dụng vanilin và axit vanilic. Đã báo cáo rằng, axit ferulic là chất liên quan đến vanilin, nhưng không trực tiếp tham gia vào quá trình tạo ra guaiacol của AAT. Phương pháp của sáng chế dựa vào việc phát hiện ra rằng axit vanilic không ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn tạo ra guaiacol, trong khi nó ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn thuộc chi *Alicyclobacillus* mà không tạo ra guaiacol. Mặc dù AAT được biết là tạo ra guaiacol trong môi trường chứa axit vanilic, lần đầu tiên trong sáng chế phát hiện ra rằng tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn tạo ra guaiacol khác với vi khuẩn không tạo ra guaiacol trên môi trường rắn chứa axit vanilic. Theo sáng chế, sự sinh trưởng của vi khuẩn không tạo ra guaiacol bị kìm hãm cho phép vi khuẩn tạo ra guaiacol sinh trưởng ưu thế, vì vậy vi khuẩn tạo ra guaiacol có thể được phát hiện một cách chọn lọc.

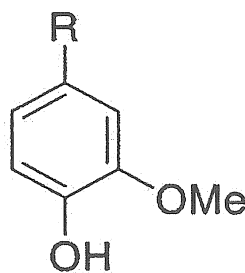
Mẫu xét nghiệm được thử nghiệm bằng phương pháp của sáng chế bao gồm các nguyên liệu thô, các nguyên liệu sơ chế và các sản phẩm đồ uống và đồ ăn, bị nghi ngờ là chứa vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt. Cụ thể hơn, nó bao gồm các nguyên liệu thô của nước ép quả có tính axit như nước cam ép, nước táo ép và nước cam quýt ép, các nguyên liệu sơ chế của chúng, nước ép cô đặc của chúng, đồ uống và đồ ăn được sản xuất từ các nguyên liệu thô của nước ép quả này. Vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt không bị tiêu diệt hoàn toàn dưới điều kiện xử lý nhiệt thường được sử dụng trong khử trùng đồ uống và đồ ăn, và chúng có thể sinh trưởng trong các sản phẩm chứa nước ép quả đã pha loãng, mặc dù chúng không thể sinh trưởng trong nước ép quả cô đặc do sự có mặt các chất ức chế. Do đó, các mẫu bất kỳ có thể được thử nghiệm bằng phương pháp của sáng chế để kiểm soát chất lượng phụ thuộc vào đặc tính của các nguyên liệu thô và các sản phẩm cũng như hệ thống phân phối. Theo phương pháp của sáng chế, vi khuẩn tạo ra guaiacol có thể được phát hiện trực tiếp và định lượng trực tiếp bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc được tạo ra trên môi trường và bước nuôi cấy trước hoặc bước xử lý để kiểm tra (hiện

màu bằng phương pháp peroxidaza) được yêu cầu trong các phương pháp thông thường là không cần thiết.

Môi trường dùng cho vi khuẩn tạo ra guaiacol theo sáng chế và bộ kit để phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol bằng cách sử dụng môi trường này không yêu cầu sử dụng các thiết bị hoặc chất phản ứng để thực hiện bước nuôi cấy trước và bước xử lý để kiểm tra và sẽ góp phần để thử nghiệm nhanh và đơn giản bằng bộ kit gọn nhẹ.

Vi khuẩn tạo ra guaiacol được phát hiện bằng phương pháp của sáng chế chủ yếu là *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT) và *Alicyclobacillus acidiphilus* (AAP), là các vi khuẩn đã được xác định. Trong số chúng, AAT thường được phát hiện trong các nguyên liệu thô của nước ép quả, trong khi hiếm khi phát hiện thấy AAP. Do đó, để kiểm soát chất lượng, có thể là đủ nếu như AAT có thể được phát hiện. Tuy nhiên, như được mô tả dưới đây, phương pháp của sáng chế có thể được tiến hành dưới điều kiện cho phép chỉ phát hiện AAT hoặc dưới điều kiện cho phép phát hiện cả AAT và AAP bằng cách thay đổi hàm lượng axit vanilic trong môi trường. Phương pháp của sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện các vi khuẩn khác thuộc chi *Alicyclobacillus* có thể tạo ra guaiacol. Các vi khuẩn này đã được mô tả trong một số báo cáo nhưng không được nghiên cứu chi tiết. Vi khuẩn thuộc chi *Alicyclobacillus* không tạo ra guaiacol cũng đã biết, bao gồm *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus pomorum* và các vi khuẩn tương tự.

Phương pháp của sáng chế có thể sử dụng môi trường chọn lọc, ở đó chỉ vi khuẩn tạo ra guaiacol tạo thành khuẩn lạc một cách chọn lọc. Môi trường chọn lọc là môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa một hoặc nhiều hợp chất có khung metoxyphenol có công thức:



trong đó R là -H, -OH, -C(O)H, -C(O)CH₃, -COOH, C₁-C₃ alkyl hoặc C₁-C₃ alkenyl, trong đó alkyl và alkenyl tùy ý có thể được thế bằng -OH, -C(O)H hoặc -COOH.

Hợp chất có khung metoxyphenol tốt hơn bao gồm vanilin (R=C(O)H), axit vanilic (R=COOH), axit ferulic (R=CH=CH-COOH), guaiacol (R=H), 4-hydroxy-3-

metoxy-phenylacrylaldehyt ($R=CH=CH-C(O)H$), axit 4-hydroxy-3-metoxyphenyl propionic ($R=CH_2CH_2COOH$), rượu 4-hydroxy-3-metoxyphenylmetylic ($R=CH_2OH$), metoxyhydro-quinon ($R=OH$), 4-hydroxy-3-metoxyphenyl axetaldehyt ($R=C(O)CH_3$) và 4-vinylguaiacol ($R=CH_2=CH_2$). Tất cả các hợp chất này được thông báo là được tạo ra bởi vi sinh vật làm chất chuyển hóa của axit ferulic.

Đặc biệt tốt hơn là, hợp chất có khung metoxyphenol được chọn từ vanilin, axit vanilic và axit ferulic. Theo cách khác, hỗn hợp của hai hoặc ba chất gồm vanilin, axit vanilic và axit ferulic cũng có thể được sử dụng. Một trong số các môi trường thường được sử dụng cho vi khuẩn ưa axit có thể được sử dụng trong sáng chế. Một môi trường ưu tiên là môi trường YSG (chứa dịch chiết nấm men, tinh bột hòa tan và glucoza, độ pH từ 3,0 đến 4,0) dễ dàng mua được và đã được nghiên cứu rộng rãi. Vanilin, axit vanilic và axit ferulic được bán trên thị trường. Nồng độ của vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic được bổ sung vào môi trường có thể được chọn như dưới đây phụ thuộc vào nhu cầu phát hiện cả AAT và AAP, hay chỉ cần phát hiện AAT.

Khi chỉ cần phát hiện mình AAT là đủ, có thể sử dụng axit vanilic với lượng lớn hơn hoặc bằng 50ppm. Tốt hơn nếu nồng độ của axit vanilic nằm trong khoảng từ 50 đến 225ppm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75 đến 200ppm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 200ppm. Khi vanilin được sử dụng, thì nồng độ của nó có thể lớn hơn hoặc bằng 500ppm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 900 đến 1000ppm. Khi axit ferulic được sử dụng, thì nồng độ của nó có thể nằm trong khoảng từ 25ppm đến 50ppm, tốt hơn là bằng 50ppm.

Khi cần phát hiện cả AAT và AAP, có thể sử dụng axit vanilic với nồng độ nằm trong khoảng từ 50ppm đến 75ppm. Các phương pháp phát hiện thông thường chủ yếu tập trung vào AAT thường được phát hiện trong mẫu so với các vi khuẩn tạo ra guaiacol khác. Ngược lại, phương pháp của sáng chế cho phép phát hiện các vi khuẩn tạo ra guaiacol khác như AAP bằng cách lựa chọn lượng axit vanilic thích hợp.

Nồng độ của các hợp chất chứa khung metoxyphenol khác với vanilin, axit vanilic và axit ferulic cũng có thể được tối ưu hóa theo cách tương tự cách được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Môi trường rắn có thể được chuẩn bị theo cách thông thường bằng cách bổ sung vào môi trường thạch YSG và lượng định trước của một hoặc nhiều hợp chất có khung metoxyphenol, khử trùng hỗn hợp này và làm rắn thạch. Do độ pH của môi trường thấp,

nên môi trường có thể không được đông rắn đủ khi nó được hấp cùng với thạch. Do đó, tốt hơn là điều chỉnh lượng thạch thích hợp hoặc khử trùng môi trường và thạch riêng biệt trước khi trộn chúng với nhau hoặc bổ sung axit để điều chỉnh độ pH sau khi khử trùng hỗn hợp của môi trường có độ pH gần như trung tính và thạch. Môi trường rắn có thể được chuẩn bị trong đĩa dùng cho xét nghiệm kính phết hoặc trong bình thót cổ hoặc chai để rót.

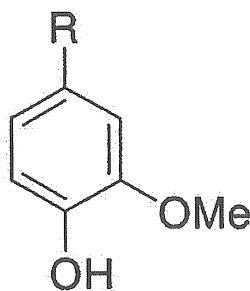
Theo phương pháp của sáng chế, mẫu xét nghiệm ở nguyên dạng hoặc ở dạng pha loãng thích hợp được bổ sung vào môi trường rắn và được nuôi cấy trên đĩa. Mẫu xét nghiệm có thể được pha loãng liên tiếp (1, 1/10, 1/100 v.v) để thuận tiện đếm khuẩn lạc. Do vi khuẩn thuộc chi *Alicyclobacillus* tạo ra các bào tử, nên tốt hơn là mẫu xét nghiệm được xử lý sốc nhiệt với việc xử lý nhiệt ở nhiệt độ bằng 70°C trong thời gian 20 phút trước khi bổ sung vào môi trường để hoạt hóa tế bào vi khuẩn. Khi việc phát hiện được tiến hành bằng phương pháp rót, mẫu xét nghiệm được bổ sung và được trộn với môi trường thạch đã tan chảy và hỗn hợp được chuyển sang đĩa để đông rắn. Khi việc phát hiện được thực hiện bằng phương pháp phết, mẫu xét nghiệm có thể được phết lên trên môi trường rắn trong đĩa. Khi việc phát hiện được tiến hành bằng bộ lọc màng, thì mẫu xét nghiệm được lọc qua bộ lọc màng và thiết bị lọc được đặt trên môi trường rắn trong đĩa.

Việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở nhiệt độ bất kỳ trong khoảng nhiệt độ sinh trưởng của vi khuẩn tạo ra guaiacol (từ 20°C đến 55°C). Tuy nhiên, để cải thiện tính chọn lọc đối với vi khuẩn không tạo ra guaiacol, việc nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ 50°C hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 45°C hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 40°C hoặc thấp hơn, đặc biệt tốt hơn nếu nhiệt độ bằng 30°C (từ 27°C đến 33°C). Theo sáng chế, nhiệt độ có sự sai khác $\pm 10\%$ sẽ cho hiệu quả tương tự. Theo sáng chế, bất ngờ phát hiện ra rằng, độ nhạy phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol được cải thiện đáng kể bằng cách bổ sung axit vanilic vào môi trường rắn. Ví dụ, đã quan sát thấy rằng, số lượng khuẩn lạc thu được giống nhau khi AAT được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày và ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày trên môi trường rắn giống nhau chứa axit vanilic nồng độ 75ppm. Điều này có nghĩa là phương pháp của sáng chế cho phép định lượng chính xác AAT trong khoảng nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của AAT. Do đó, phương pháp của sáng chế cải thiện đáng kể độ nhạy phát hiện và là phương pháp cải tiến cho phép không chỉ loại bỏ được bước nuôi cấy

trước, mà còn định lượng một cách chính xác, nhanh chóng và thuận tiện hơn. Hơn nữa, vi khuẩn không mong muốn không được phát hiện do nhiệt độ thấp và sự có mặt axit vanilic. Kết quả tương tự quan sát được khi sử dụng vanilin hoặc axit ferulic thay vì axit vanilic.

Sự có mặt hoặc không có mặt vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm có thể được xác định bằng cách đánh giá trực quan khuẩn lạc sau khi nuôi cấy trong khoảng thời gian định trước, ví dụ từ 3 đến 5 ngày. Số lượng tế bào vi khuẩn trong mẫu xét nghiệm có thể được tính một cách dễ dàng bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc và tỷ lệ pha loãng của mẫu xét nghiệm. Theo sáng chế, kết quả định lượng chính xác có thể thuận tiện thu được mà không yêu cầu các thiết bị chuyên dụng hoặc chuyên gia trong lĩnh vực.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm. Bộ kit này bao gồm ít nhất môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit bao gồm một hoặc nhiều hợp chất có khung metoxyphenol có công thức sau:



trong đó R là -H, -OH, -C(O)H, -C(O)CH₃, -COOH, C₁-C₃ alkyl hoặc C₁-C₃ alkenyl, trong đó alkyl và alkenyl tùy ý có thể được thế bằng -OH, -C(O)H hoặc -COOH. Môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit có thể được cung cấp ở dạng đã khử trùng trong đĩa hoặc bình thót cổ hoặc chai để rót. Bộ kit được sử dụng trong phương pháp này bao gồm bộ lọc màng có thể còn bao gồm bộ lọc màng và thiết bị lọc. Bộ kit này còn có thể bao gồm đĩa để chuẩn bị pha loãng liên tiếp, vi khuẩn tạo ra guaiacol đối chứng dương và hướng dẫn sử dụng.

Nội dung của các sáng chế và các tài liệu tham chiếu được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết thêm bằng các ví dụ, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Môi trường thạch YSG chứa vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic được sử dụng

để nghiên cứu sự tạo thành khuẩn lạc của vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt (TAB). 4 chủng vi khuẩn được sử dụng là *A. acidoterrestris* ATCC49025, *A. acidiphilus* JCM21417, *A. acidocaldarius* ATCC27009 và *A. pomorum* JCM21459. Trong số các chủng này, *A. acidoterrestris* ATCC49025 và *A. acidiphilus* JCM21417 được báo cáo là chủng vi khuẩn tạo ra guaiacol.

Môi trường YSG (Merck K.K., YGS Agar; 20,0g) và axit vanilic (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; từ 0 đến 250mg) được hoà tan trong 1000g nước bằng cách gia nhiệt và hấp khử trùng (nhiệt độ 121°C và 15 phút). Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ khoảng 50°C, độ pH được điều chỉnh đến 3,7 bằng axit sulfuric 10% và môi trường đĩa được chuẩn bị.

Thể huyền phù của các chủng vi khuẩn tương ứng được xử lý sốc nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 20 phút. Thể huyền phù của vi khuẩn được pha loãng liên tiếp bằng dung dịch muối đệm phosphat đến 10^3 CFU/ml và 100µL từ dịch pha loãng được phết lên các đĩa để nuôi cấy. Việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày trước khi đánh giá trực quan khuẩn lạc tạo thành.

Khi bổ sung axit vanilic nồng độ 75ppm, thì phát hiện có khuẩn lạc của hai chủng vi khuẩn tạo ra guaiacol với cùng mức độ hoặc cao hơn trong môi trường không chứa axit vanilic, trong khi không phát hiện thấy khuẩn lạc của hai chủng còn lại. Khi bổ sung axit vanilic nồng độ 100ppm, thì phát hiện thấy có khuẩn lạc của *A. acidoterrestris* ATCC49025 với cùng mức độ hoặc cao hơn trong môi trường không chứa axit vanilic, trong khi không phát hiện thấy khuẩn lạc của ba chủng vi khuẩn còn lại. Khi sử dụng axit vanilic nồng độ nằm trong khoảng từ 150ppm đến 200ppm, thì phát hiện thấy có *A. acidoterrestris* ATCC49025 ở cùng mức độ như trong môi trường không chứa axit vanilic. Độ nhạy phát hiện của AAT thấp hơn trong trường hợp môi trường chứa axit vanilic nồng độ 225ppm và không phát hiện thấy khuẩn lạc trong trường hợp môi trường chứa axit vanilic nồng độ lớn hơn hoặc bằng 250ppm.

Các thí nghiệm tương tự được thực hiện bằng cách thay thế axit vanilic bằng vanilin hoặc axit ferulic. Khi môi trường không đông rắn dễ dàng, thì lượng thạch sẽ được điều chỉnh một cách thích hợp. Kết quả của ví dụ 1 được tóm tắt trong các bảng dưới đây.

Bảng 1

Các kết quả thử nghiệm có bổ sung axit vanilic (nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày)

Tên chủng	Số	Nồng độ của axit vanilic (ppm)*							
		10	50	75	100	150	200	225	250
<i>A.acidoterrestris</i>	ATCC49025	++	++	++	++	++	++	+	-
<i>A.acidiphilus</i>	JCM21417	++	++	++	-	-	-	-	-
<i>A.acidocaldarius</i>	ATCC27009	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>A.pomorum</i>	JCM21459	++	-	-	-	-	-	-	-

Các kết quả thử nghiệm có bổ sung vanilin (nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày)

Tên chủng		Nồng độ vanilin (ppm)*					
		500	750	900	950	1000	
<i>A.acidoterrestris</i>	ATCC49025	++	++	++	++	++	+
<i>A.acidiphilus</i>	JCM21417	+	+	+	-	-	-
<i>A.acidocaldarius</i>	ATCC27009	-	-	-	-	-	-
<i>A.pomorum</i>	JCM21459	-	-	-	-	-	-

Các kết quả thử nghiệm có bổ sung axit ferulic (nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày)

Tên chủng		Nồng độ axit ferulic (ppm)*		
		25	50	75
<i>A.acidoterrestris</i>	ATCC49025	++	++	-
<i>A.acidiphilus</i>	JCM21417	++	-	-
<i>A.acidocaldarius</i>	ATCC27009	-	-	-
<i>A.pomorum</i>	JCM21459	-	-	-

* "++" có nghĩa là mức độ được phát hiện thấp hơn mức độ của môi trường không chứa cơ chất (tức là môi trường YSG),

"+" có nghĩa là mức độ được phát hiện thấp hơn mức độ của môi trường không chứa cơ chất và "-" nghĩa là không phát hiện được.

Ví dụ 2

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên mức độ phát hiện khuẩn lạc của *A. acidoterrestris* ATCC49025 được nghiên cứu bằng cách sử dụng môi trường thạch YSG chứa vanilin, axit vanilic hoặc axit ferulic. Môi trường rắn được chuẩn bị theo cách tương tự như trong ví dụ 1 bằng cách bổ sung axit vanilic nồng độ 75ppm vào môi trường YSG. Các thể huyền phù chứa cùng số lượng tế bào vi khuẩn *A. acidoterrestris* ATCC49025 được phết lên đĩa và nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C hoặc 30°C. Môi trường YSG không chứa cơ chất bất kỳ được sử dụng làm đối chứng.

Số lượng khuẩn lạc sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày và ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày được thể hiện trong bảng sau. Các giá trị được thể hiện là các giá trị tương đối của số lượng khuẩn lạc thu được sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày trong môi trường YSG không chứa cơ chất bất kỳ được xem là bằng 100.

Bảng 2

	45°C, 3 ngày	30°C, 5 ngày
Không chứa cơ chất	100	21
Axit vanilic nồng độ 75ppm	183	186

Khi môi trường YSG không chứa cơ chất bất kỳ được sử dụng, thì việc nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày có thể tạo ra khuẩn lạc có thể phát hiện ít hơn khi nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày, cho thấy rằng cần có bước nuôi cấy trước trong phương pháp nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C.

Mặt khác, khi bổ sung axit vanilic nồng độ 75ppm, thì phát hiện thấy nhiều khuẩn lạc ở nhiệt độ 45°C hơn môi trường không chứa cơ chất bất kỳ. Điều này gợi ý rằng, việc bổ sung axit vanilic tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo thành khuẩn lạc *A. acidoterrestris* ATCC49025 và cải thiện độ nhạy phát hiện. Độ nhạy phát hiện cũng được cải thiện khi sử dụng axit vanilic nồng độ 50ppm, vanilin nồng độ 750ppm hoặc axit ferulic nồng độ 25ppm thay vì axit vanilic nồng độ 75ppm.

Khi bổ sung axit vanilic nồng độ 75ppm, thì hầu hết số khuẩn lạc được phát hiện khi nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày và ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 ngày là như nhau. Kết hợp với kết quả trong ví dụ 1. Chứng tỏ rằng sự có mặt axit

vanilic ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn không tạo ra guaiacol. Kết quả này cho thấy rằng, vi khuẩn tạo ra guaiacol có thể được phát hiện với độ đặc hiệu và độ nhạy cao khi mẫu xét nghiệm được nuôi cấy trong môi trường chứa axit vanilic ở nhiệt độ 30°C.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế là hữu dụng trong việc kiểm soát chất lượng thực phẩm và đồ uống và các nguyên liệu thô sản xuất chúng. Sáng chế cho phép phát hiện trực tiếp cũng như định lượng trực tiếp vi khuẩn tạo ra guaiacol mà không cần bước nuôi cấy trước hoặc bước xử lý để kiểm tra (hiện màu bằng phương pháp peroxidaza), vì vậy có thể giảm đáng kể thời gian và chi phí để phát hiện vi khuẩn mà có thể làm giảm chất lượng sản phẩm. Bộ kit để phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol theo sáng chế có khả năng áp dụng công nghiệp do nó có kích thước nhỏ và thuận tiện, không cần thiết bị và chất phản ứng cho bước nuôi cấy trước và bước xử lý để kiểm tra và cho phép phát hiện nhanh chóng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện vi khuẩn tạo ra guaiacol trong mẫu xét nghiệm bao gồm các bước:

nuôi cấy mẫu xét nghiệm hoặc dịch pha loãng của chúng trên môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit, môi trường này chứa axit vanilic với lượng nằm trong khoảng từ 50ppm đến 225ppm, vanilin với lượng nằm trong khoảng từ 500ppm đến 1000ppm hoặc axit ferulic với lượng nằm trong khoảng từ 25ppm đến 50ppm; và

phát hiện khuẩn lạc được tạo ra trên môi trường rắn này.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa axit vanilic với lượng nằm trong khoảng từ 50ppm đến 225ppm.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa axit vanilic với lượng nằm trong khoảng từ 50ppm đến 75ppm.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 55°C.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó bước nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 27°C đến 33°C.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn tạo ra guaiacol là vi khuẩn ưa axit chịu nhiệt (TAB).

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn tạo ra guaiacol là vi khuẩn thuộc chi *Alicyclobacillus*.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn tạo ra guaiacol là *Alicyclobacillus acidoterrestris* và/hoặc *Alicyclobacillus acidiphilus*.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu xét nghiệm bao gồm nước quả ép.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường rắn dùng cho vi khuẩn ưa axit chứa axit vanilic với lượng nằm trong khoảng từ 50ppm đến 75ppm hoặc vanilin với lượng nằm trong khoảng từ 500ppm đến 900ppm.