



(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)



1-0027023

(51)⁷ C12P 13/00; C12R 1/145

(13) B

(21) 1-2015-03967

(22) 07/03/2014

(86) PCT/IB2014/059539 07/03/2014

(87) WO 2014/141023 A1 18/09/2014

(30) 61/789,062 15/03/2013 US; 14/066,089 29/10/2013 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/01/2016 334A

(73) DUCTOR OY (FI)

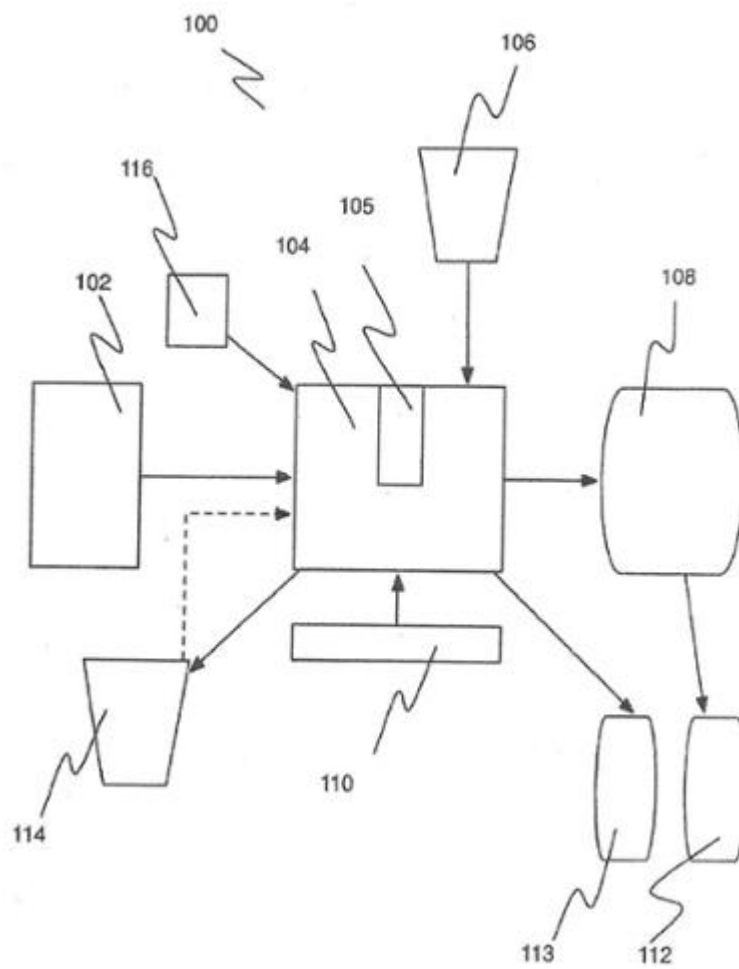
Viikinkaari 4, Cultivator II, FI-00790 Helsinki, Finland

(72) OKSANEN, Ilona (FI); KOSKENNIEMI, Kerttu (FI); VIROLAINEN, Nina (FI);
HERNESNIEMI, Saara (FI); KÄÄRIÄINEN, Susanna (FI).

(74) CÔNG TY LUẬT TNHH IP MAX (IPMAX LAW FIRM)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT AMONIAC HOẶC AMONI TỪ NGUYÊN LIỆU HỮU CƠ BẰNG CÁCH AMONI HÓA BỞI CÁC QUẦN THỂ VI KHUẨN HỖN HỢP VÀ QUẦN THỂ VI KHUẨN HỖN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất amoniac hoặc amoni từ nguyên liệu hữu cơ bằng cách lên men môi trường chứa nguyên liệu hữu cơ với sự có mặt của quần thể vi khuẩn hỗn hợp có khả năng amoni hoá, trong đó công đoạn lên men này được thực hiện trong các điều kiện, và trong khoảng thời gian đủ, để tạo ra sản phẩm lên men chứa amoniac hoặc amoni. Nguyên liệu hữu cơ này bao gồm các hợp chất nitơ thích hợp để chuyển hoá thành amoniac hoặc amoni. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quần thể vi khuẩn hỗn hợp để amoni hóa nguyên liệu hữu cơ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất amoniac và/hoặc amoni từ nguyên liệu hữu cơ bằng quy trình lên men hoặc nuôi cấy vi sinh vật sử dụng quần thể vi sinh vật hỗn hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Amoniac (NH_3) là một trong số các hợp chất hoá học được sản xuất nhiều nhất trên thế giới. Sản lượng toàn cầu đối với sản phẩm này đã đạt đến 131 triệu tấn (hệ mét) vào năm 2010 (US Geological Survey 2012). Phần lớn amoniac sản xuất ra được sử dụng trong các phân bón hoá học để cung cấp nitơ cần thiết cho quá trình sinh trưởng của cây trồng. Ngoài ra, amoniac cũng đã được sử dụng để sản xuất chất dẻo, sợi và nhựa tổng hợp, chất nổ, nhiều hợp chất hoá học khác.

Chu trình nitơ là quá trình chuyển hoá nitơ giữa các dạng hoá học khác nhau của nó. Quá trình khoáng hoá nitơ trong các đại phân tử hữu cơ, tức là quá trình chuyển hoá nitơ hữu cơ thành amoni hoặc amoniac, được gọi là quá trình amoni hoá. Bước giải phóng nitơ hữu cơ dưới dạng amoniac là một phần của chu trình nitơ, và được thực hiện bởi các vi khuẩn amoni hoá.

Amoni hoá có thể được sử dụng để giải phóng nitơ từ các chất thải hữu cơ. Ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 13/722,228 đã mô tả phương pháp amoni hoá. Trong phương pháp được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 13/722,228, chất hữu cơ có mặt trong môi trường được cho tiếp xúc với enzym thuỷ phân để tạo ra môi trường chứa chất hữu cơ đã thuỷ phân hoặc thuỷ phân một phần thích hợp để lên men hoặc nuôi cấy vi sinh vật. Quá trình

lên men được thực hiện với sự có mặt của ít nhất một vi sinh vật có khả năng amoni hoá. Vi sinh vật này có thể thuộc giống *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Clostridium* và *Entrococcus*. Phương pháp này cho năng suất tạo amoni đến khoảng 800 mg/lít.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20110126455 đã mô tả phương pháp sản xuất nguyên liệu cấy, nguyên liệu này có thể được sử dụng trong quy trình khoáng hoá để sản xuất môi trường thủy canh. Nguyên liệu cấy được tạo ra trong quy trình này có thể tạo ra nồng độ ion nitrat đến 400 mg/lít và thời gian cần thiết để hoàn thành quy trình khoáng hoá thường là khoảng 4-8 ngày.

Do đó, vẫn có nhu cầu đã tồn tại từ lâu trong lĩnh vực này đối với các phương pháp bổ sung có chi phí hợp lý để sản xuất amoniac từ nguyên liệu hữu cơ, như từ chất thải hữu cơ, chẳng hạn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế, theo các phương án khác nhau, đề xuất quy trình sản xuất amoniac hoặc amoni từ nguyên liệu hữu cơ, trong đó quy trình này bao gồm công đoạn:

- lên men, trong điều kiện ưa khí hoặc kỵ khí, môi trường nước chứa nguyên liệu hữu cơ với sự có mặt của một quần thể vi khuẩn hỗn hợp có khả năng amoni hoá, trong đó công đoạn lên men này được thực hiện trong các điều kiện, và trong khoảng thời gian đủ, để tạo ra sản phẩm lên men chứa amoniac hoặc amoni;

- trong đó nguyên liệu hữu cơ này chứa các hợp chất nitơ thích hợp để chuyển hoá thành amoniac hoặc amoni. Tốt hơn nếu các hợp chất nitơ này là amin hoặc protein.

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, quy trình này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 60°C. Tốt hơn nữa nếu quy trình này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 55°C, hoặc từ 40 đến 50°C.

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, quy trình này được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 11. Tốt hơn nữa nếu quy trình này được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9.

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, quy trình lên men này có thể được thực hiện trong điều kiện kỵ khí hoặc ưa khí trong buồng hoặc thùng phản ứng thích hợp trong khoảng thời gian và khoảng nhiệt độ hữu hiệu để khử nguyên liệu hữu cơ một cách hữu hiệu.

Tốt hơn nếu quy trình này được thực hiện với quần thể vi khuẩn hỗn hợp chứa quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm H1, C1, P1, S1, A1, PB-M, MF-M, FO1 và FI1. Tốt hơn nếu quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự này có hệ số tương quan là 0,80, tốt hơn nữa nếu hệ số tương quan là 0,90, và thậm chí tốt hơn nữa nếu hệ số tương quan là 0,95, so với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm H1, C1, P1, S1, A1, PB-M, MF-M, FO1 và FI1.

Theo một số phương án nhất định, quần thể vi khuẩn hỗn hợp này là về cơ bản tương tự với quần thể vi khuẩn hỗn hợp S1 (số hiệu lưu giữ CBS số (CBS Accession No.) 136063). Tốt hơn nếu quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự với S1 này có hệ số tương quan là 0,80, tốt hơn nữa nếu hệ số tương quan là 0,90, và thậm chí tốt hơn nữa nếu hệ số tương quan là 0,95, so với quần thể vi khuẩn hỗn hợp S1.

Theo các phương án khác, ít nhất một nửa các tế bào trong quần thể vi khuẩn hỗn hợp này chứa *Sporanaerobacter acetigenes* và/hoặc *Clostridium* spp.

Theo một phương án khác, quần thể vi khuẩn hỗn hợp này chứa *Sporanaerobacter acetigenes* với lượng khoảng 50-95% và *Clostridium* spp với lượng khoảng 3-35%. Lượng lũy tích của *Sporanaerobacter acetigenes* và/hoặc *Clostridium* spp là 70% hoặc lớn hơn. Tốt hơn nếu quần thể vi khuẩn hỗn hợp này chứa *Sporanaerobacter acetigenes* với lượng khoảng 50-90% và *Clostridium* spp với lượng khoảng 5-15%.

Theo một phương án khác, lượng lũy tích của *Sporanaerobacter acetigenes* và/hoặc *Clostridium* spp là 85% hoặc lớn hơn. Theo một phương án bổ sung, quần thể vi khuẩn hỗn hợp này chứa ít nhất là 90% các vi khuẩn thuộc bộ *Clostridiales*.

Tốt hơn nếu quy trình theo sáng chế còn bao gồm công đoạn thu hồi amoniac hoặc amoni, bằng phương pháp cơ học hoặc bằng cách kết tủa, từ sản phẩm lên men. Amoniac hoặc amoni được tùy ý thu hồi bằng các bước bao gồm:

(a) tách các sản phẩm lên men rắn và lỏng;

(b) thu hồi sản phẩm lên men lỏng chứa amoniac hoặc nước chứa amoni hoặc thu hồi hỗn hợp khí được giải phóng trong quy trình lên men hoặc trong bước tách (a); và

(c) thu hồi amoniac hoặc amoni.

Trong quy trình theo sáng chế, tốt hơn nếu nguyên liệu hữu cơ một hoặc nhiều nguyên liệu trong số các nguyên liệu sau: bột thịt và xương (meat and bone meal – MBM), bột động vật, sản phẩm phụ của động vật, chất thải lò mổ, nước sữa, chất thải đô thị, các loại chất thải của công nghiệp thực phẩm và lên men và tổ hợp của chúng. Các loại chất thải của công nghiệp thực phẩm là sản phẩm phụ của động vật, bột động vật và chất thải thực phẩm, chẳng hạn.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm H1, C1, P1, S1, A1, PB-M, MF-M, FO1 và FI1. Tốt hơn nếu quần thể vi khuẩn hỗn hợp này là về cơ bản tương tự với quần thể vi khuẩn hỗn hợp S1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là sơ đồ minh họa việc xác định khoảng nhiệt độ tối ưu để amoni hoá nitơ trong protein của bột thịt và xương (“MBM”) bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp A1, C1, H1, P1 và S1 trong Ví dụ 1. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac, tức là hiệu suất

amoni hoá sau khi ủ trong thời gian 7 ngày ở các nhiệt độ khác nhau. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn giữa hai mẫu lặp sinh học. Khoảng nhiệt độ tối ưu để amoni hoá bởi A1, C1, H1 và P1 là 37-55°C, và đối với S1 là 37-60°C. Chữ “RT” được dùng để thể hiện nhiệt độ trong phòng.

FIG.2 là sơ đồ minh họa việc xác định khoảng độ pH tối ưu để amoni hoá nitơ trong protein của MBM bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp A1, C1, H1, P1, và S1 trong Ví dụ 1. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac, tức là hiệu suất amoni hoá sau khi ủ trong thời gian 7 ngày ở 50°C. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn giữa hai mẫu lặp sinh học. Khoảng độ pH tối ưu để amoni hoá bởi A1, C1, H1, P1, và S1 là 6-9. Chữ “N” được dùng để thể hiện nitơ trong các hợp chất được chuyển hoá thành NH_3 .

FIG.3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G và 3H là các sơ đồ minh họa hiệu suất amoni hoá các nguyên liệu hữu cơ khác nhau bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp H1, C1, P1, S1, và A1 trong Ví dụ 2. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn giữa hai mẫu lặp sinh học với ba mẫu lặp kỹ thuật trong mỗi mẫu. Các nguyên liệu hữu cơ là: FIG.3A: Sản phẩm phụ của cá, FIG.3B: Sản phẩm phụ của gà giò, FIG.3C: Sản phẩm phụ của bò/lợn, FIG.3D: Dịch ngâm etanol sinh học, FIG.3E: Bột thịt và xương 1, FIG.3F: Bột thịt và xương 2, FIG.3G: Bột cá, FIG.3H: Bột lông vũ. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac, tức là hiệu suất amoni hoá sau khi ủ ở 50°C trong những khoảng thời gian khác nhau. Quần thể S1 là đáng chú ý nhất do nó amoni hoá một cách hữu hiệu các nguyên liệu được thể hiện bởi FIG.3D và 3G, trong khi quần thể H1 amoni hoá nhanh các nguyên liệu được thể hiện bởi FIG.3C, 3D và 3E. Tóm lại, tất cả năm quần thể đều làm tăng hiệu suất amoni hoá so với các mẫu đối chứng không được cấy. Tác dụng này là đặc biệt rõ rệt ở các nguyên liệu được thể hiện bởi FIG.3C, 3D, 3E, và 3F. Chữ “d” được dùng để thể hiện ngày.

FIG.4 là sơ đồ minh họa mức amoni hoá môi trường là sản phẩm phụ của cá và môi trường là sản phẩm phụ của gà trong lò phản ứng sinh học ở

+50°C không chứa nguyên liệu cấy là vi khuẩn và sử dụng quần thể vi khuẩn P1 trong Ví dụ 4. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn của ba lần đo amoniac lặp.

FIG.5 là sơ đồ minh họa việc xác định khoảng nhiệt độ để gây cảm ứng các quần thể hỗn hợp từ bột thịt và xương (“MBM”) không vô trùng từ hai nhà sản xuất khác nhau (MBM1 và MBM2) trong Ví dụ 5. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac, tức là hiệu suất amoni hoá sau khi ủ trong thời gian 7 ngày ở các nhiệt độ khác nhau. Các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn giữa hai mẫu lặp sinh học, ngoại trừ MBM1 ở 45°C và 55°C lần lượt với 4 và 7 mẫu lặp. Các quần thể MBM2 được gây cảm ứng một cách hữu hiệu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng (room temperature – RT) đến 70°C, trong khi MBM1 có nhiệt độ tối ưu để chuyển hoá nitơ một cách hữu hiệu ở 50°C. Chữ “RT” được dùng để thể hiện nhiệt độ trong phòng.

FIG.6 là sơ đồ minh họa một ví dụ về quy trình amoni hoá các sản phẩm phụ của lò mổ trong phần Bàn luận, dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp chiết nitơ từ các nguyên liệu hữu cơ bằng cách amoni hoá bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp. Nguyên liệu hữu cơ có thể là nguyên liệu hữu cơ giàu protein bất kỳ, ví dụ, nguyên liệu hữu cơ có nguồn gốc từ động vật hoặc thực vật. Để hiểu sáng chế rõ hơn, các thuật ngữ dưới đây được định nghĩa. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ nêu dưới đây được sử dụng và định nghĩa như được trình bày. Phần định nghĩa cho các thuật ngữ khác có thể được thể hiện trong toàn bộ bản mô tả sáng chế. Cần hiểu rằng tất cả các thuật ngữ ở số ít cũng bao hàm dạng số nhiều, thể chủ động và thì quá khứ của thuật ngữ này, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “hợp chất nitơ” được dùng để chỉ các hợp chất nitơ thích hợp để chuyển hoá thành amoniac hoặc amoni bằng quy trình theo sáng chế, ví dụ, nitơ hữu cơ, bao gồm amin, protein và các chất tương tự. Ví dụ về nguyên liệu

hữu cơ như vậy bao gồm nguyên liệu chứa amin, ví dụ, nguyên liệu protein như, bột thịt và xương (MBM), chất thải lò mổ, nước sữa, chất thải đô thị, bột cá, các loại chất thải của công nghiệp thực phẩm, ví dụ, sản phẩm phụ của động vật và thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bột của thịt và xương, cá, và lông vũ, cũng như củ cải đường, các cây họ đậu, quả, và chất thải của công nghiệp đường. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “MBM” “bột thịt và xương” là như được định nghĩa trong Quy chế số 142/2011 của Ủy ban châu Âu, “bột thịt và xương nghĩa là protein động vật thu được từ việc xử lý các nguyên liệu thuộc Nhóm (Category) 1 hoặc Nhóm 2 theo một trong số các phương pháp xử lý được quy định trong Chương III của Phụ lục IV”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bột động vật” là bột được sản xuất từ nguyên liệu động vật (như chất thải lò mổ). Trong các Ví dụ dưới đây, “bột động vật” là nguyên liệu dạng bột. Theo một quy trình sản xuất, bột là chất thải lò mổ và được chiết hơi ẩm (tức là sấy khô), sau đó nghiền chất rắn đã sấy khô này.

“Nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật” được định nghĩa như sau: “Dịch ngâm etanol sinh học” (St1 Oy, Phần Lan) được dùng để chỉ chất thải lên men thu được từ quá trình sản xuất etanol sinh học. “Sinh khối lúa mạch” (Senson Oy, Phần Lan) là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất nước ủ men, và “dịch ngâm lúa mạch” (Senson Oy, Phần Lan) là sản phẩm phụ quá trình sản xuất enzym lúa mạch. “Sinh khối lúa mì” (CropEnergies AG, Cộng hoà Liên bang Đức) và “bã cải dầu” (Mildola Oy, Phần Lan) là nguyên liệu được sản xuất để dùng làm thức ăn cho động vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thức ăn cho động vật” mô tả thực phẩm được chế biến để dùng làm thức ăn cho động vật.

Các thuật ngữ “lên men” hoặc “quá trình lên men” được dùng để chỉ quy trình, trong đó các phân tử hữu cơ có vai trò làm cả chất cho lẫn chất nhận điện tử. Điều này khác nhau ở quá trình hô hấp, trong đó phân tử chuyển hóa từ phân tử chất dinh dưỡng chuyển điện tử của nó sang oxy (hô hấp ưa khí) hoặc các phân tử/ion vô cơ khác như nitrat, sulfat, cacbon dioxit hoặc sắt (III) (hô

hấp ky khí). Trong quá trình lên men, phân tử chất dinh dưỡng được khử thành các phân tử hữu cơ nhỏ như axit béo và rượu dễ bay hơi. Thêm vào đó, thuật ngữ lên men được sử dụng để mô tả quá trình sinh trưởng của vi sinh vật trên môi trường sinh trưởng trong thùng đóng kín, tức là trong lò phản ứng hoặc thiết bị lên men.

Thuật ngữ “amoniac” được dùng để chỉ hợp chất NH_3 được tìm thấy ở dạng khí hoặc hoà tan ở dạng không ion hoá trong môi trường, như môi trường nước, chẳng hạn. Thuật ngữ “amoni” được dùng để chỉ ion NH_4^+ , tức là dạng ion của NH_3 được tìm thấy trong dung dịch nước, chẳng hạn. Trong dung dịch nước, amoni và amoniac tồn tại ở trạng thái cân bằng phụ thuộc vào nhiệt độ và độ pH, ví dụ nhiệt độ và độ pH càng cao, thì tỷ lệ ở dạng amoniac càng lớn. Vì lý do này, ở đây, khi đề cập đến quy trình và/hoặc vi sinh vật amoni hoá theo sáng chế và sản phẩm của nó, thuật ngữ “amoniac” cần được hiểu là bao hàm cả NH_3 và dạng NH_4^+ của hợp chất này, trừ khi có quy định khác. Ví dụ, phần mô tả các vi sinh vật amoni hoá có khả năng “sản xuất amoniac” hoặc “sản xuất amoni” được hiểu là bao hàm việc sản xuất NH_3 và/hoặc NH_4^+ theo trạng thái cân bằng $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ phát hiện thấy trong môi trường cụ thể này.

Thuật ngữ “amoni hoá” được dùng để chỉ quá trình khoáng hoá nitơ trong các đại phân tử hữu cơ, tức là chuyển hoá nitơ hữu cơ thành amoni hoặc amoniac. Quá trình này được thực hiện bởi các vi khuẩn amoni hoá và bao gồm bước thuỷ phân protein thành axit amin nhờ enzym, và giải phóng nitơ dưới dạng amoni/amoniac nhờ phản ứng loại nhóm amin và phản ứng tách. Khung cacbon của axit amin được lên men thành axit hữu cơ, đồng thời giải phóng cacbon dioxit và hydro.

Như có thể được sử dụng ở đây trong ngữ cảnh thu hồi amoni và amoniac từ sản phẩm lên men hoặc nuôi cấy, thuật ngữ “dạng hợp nhất” được dùng để chỉ việc chuyển hoá ion amoni thành một dạng hoá học khác như amoniac (NH_3) không ion và/hoặc hợp chất chứa nitơ đã biết bất kỳ trong lĩnh vực này, ví dụ hợp chất lần lượt được tạo ra bằng cách cho amoniac phản ứng

với axit nitric, axit sulfuric, axit clohydric, hoặc axit phosphoric, hoặc hợp chất bất kỳ khác tương ứng.

Các quần thể vi khuẩn hỗn hợp amoni hoá bao gồm quần thể H1, C1, P1, S1, A1, PB-M, MF-M, FO1 và FI1 và các thể biến dị của chúng, và các quần thể này sẽ được mô tả chi tiết trong phần dưới đây.

Việc phân tích quần xã vi khuẩn của các quần thể hỗn hợp H1, C1, P1, S1, và A1 được tiến hành trên ADN thu được bằng cách chiết bằng phenol-cloroform-rượu isoamyllic từ hỗn hợp nuôi cấy vi khuẩn, trong đó các tế bào được phá vỡ bằng cách gậy va đập với hạt. Các quần thể được nuôi cấy trong thời gian bốn ngày ở nhiệt độ 37°C, 50°C hoặc 55°C trong môi trường MBM vô trùng [180g bột thịt và xương (MBM) trong mỗi lít nước] hoặc nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật. Thử nghiệm trên gen 16S của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự dựa trên việc phát hiện mức giải phóng pyrophosphat (pyrosequencing) bằng cách sử dụng amplicon FLX được mã hoá bằng đoạn cài (tag) (by tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing – bTEFAP) và việc phân tích số liệu về tính đa dạng vi khuẩn được thực hiện bởi Research and Testing Lab (Lubbock, Texas, Hoa Kỳ) theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu: Dowd *et al.* 2008a và Wolcott *et al.* 2009. Các đoạn mồi 28F ‘GAGTTTGATCNTGGCTCAG’ (SEQ ID NO: 1) và 519R ‘GTNTTACNGCGGCKGCTG’ (SEQ ID NO: 2) được sử dụng để khuếch đại các vùng biến đổi 16S V1-3 (trong đó “N” là A, T/U, G hoặc C) và trong đó K là T/U hoặc G).

Việc phân tích tính đa dạng vi khuẩn cho thấy sự có mặt của các vi khuẩn thuộc 35 giống khác nhau (Bảng 1). Trong tổng số 53 kết quả, 33 kết quả được nhận biết ở mức loài và 20 kết quả ở mức giống. Bảng 2 thể hiện các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong mỗi quần thể. Các vi khuẩn thuộc 6-8 giống tạo thành phần lớn của tất cả các quần thể. *Clostridium* spp. và *Sporanaerobacter acetigenes* chiếm ưu thế ở tất cả các quần thể. Ở S1 được nuôi cấy ở nhiệt độ 55°C, *Caloramator* spp. có mặt ở mức độ phổ biến tương tự với *Clostridium* spp.

Các hệ số tương quan (Bảng 3) được tính từ số liệu được thể hiện trong Bảng 1 bằng cách sử dụng phương trình [1], trong đó X và Y được dùng để chỉ hai ma trận, ví dụ H1 và C1, mà giữa chúng được tính tương quan, x và y là các giá trị đơn bên trong một ma trận, và $\bar{x}$ và $\bar{y}$ là giá trị trung bình của tất cả các giá trị bên trong một ma trận. Loài không có mặt trong quần thể (các tế bào trống trong Bảng 1) được gán giá trị 0.

$$\text{Tương quan } (X, Y) = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad [1]$$

Thuật ngữ “về cơ bản tương tự”, được dùng cho quần thể vi khuẩn như được mô tả ở đây, nghĩa là quần thể vi khuẩn có hệ số tương quan ít nhất là 0,8, khi so sánh với một hoặc nhiều quần thể vi khuẩn được xác định trong Bảng 1. Tốt hơn nếu quần thể vi khuẩn về cơ bản tương tự có hệ số tương quan ít nhất là 0,9, và tốt hơn nữa nếu quần thể vi khuẩn về cơ bản tương tự có hệ số tương quan ít nhất là 0,95 khi so sánh với một hoặc nhiều quần thể vi khuẩn được xác định trong Bảng 1. Các phương pháp thống kê khác để so sánh các quần thể cũng có thể được sử dụng.

Bảng 3 thể hiện tính tương tự rất cao giữa tất cả các quần thể tại độ tuổi 4 ngày. Phần lớn của tất cả các quần thể chỉ chứa một ít loài và giống vẫn rất tương tự nhau trong tất cả các điều kiện được thử nghiệm và các quần thể tự nhiên có tính cạnh tranh cao hơn có mặt trong các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật. P1 là thể hệ thứ tám của quần thể được tạo ra từ MBM không vô trùng, và cho thấy vẫn giữ được các đặc tính chính của quần thể này.

Việc phân tích tính đa dạng vi khuẩn dựa trên các phương pháp phân tử để giải trình tự bị sai lệch do tính đặc hiệu và tính phổ dụng của đoạn môi (Dowd *et al.* 2008b), chẳng hạn. Do đó, phương pháp đã mô tả trên đây cần được sử dụng làm chuẩn khi tiến hành so sánh với các quần thể hỗn hợp được thể hiện trong phần dưới đây.

Bảng 1. Kết quả phân tích tính đa dạng vi khuẩn: các giống và loài trong các quần thể H1, C1, P1, S1, và A1. Quần thể S1 cũng được nuôi cấy ở nhiệt độ

37°C (được ký hiệu là S1-37), 50°C (được ký hiệu là S1-50, một mẫu lặp sinh học của S1) và 55°C (được ký hiệu là S1-55). S1 cũng được sử dụng để cấy sản phẩm phụ của gà (CBP), xương lợn và bò nghiền (CB), sản phẩm phụ của cá (MF), sản phẩm phụ của lợn-bò (PB) và lông vũ của gà (FE), với hàm lượng 20% (trọng lượng/thể tích). Tế bào từ tất cả các hỗn hợp nuôi cấy được thu hồi để chiết ADN tại độ tuổi là bốn ngày. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	A1	C1	H1	P1	S1	S1-37	S1-50	S1-55	CBP	CB	MF	PB	FE
<i>Bacillus sp.</i>	0,770	0,530	1,463	0,974	0,398		0,763	1,183	0,105	2,203		0,127	0,031
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	0,224	0,106	0,506	0,394	0,085			0,117		0,283		0,049	0,016
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		0,021											
<i>Caldicoprobacter oshimai</i>	0,050	0,042	0,113	0,021	0,085	0,035	0,111	0,105		0,030	0,021		
<i>Caloramator fervidus</i>				0,021									
<i>Caloramator sp</i>	5,045	2,669	4,295	4,042	5,200	5,765	3,608	3,351	0,126	3,378	1,623	3,176	1,369
<i>Carnobacterium divergens</i>									0,021	0,015			
<i>Catabacter sp</i>				0,021				0,012		0,030		0,019	
<i>Clostridium botulinum</i>		6,948		6,613	4,632	1,415	4,913	0,129	1,130	1,429	1,173	6,234	0,252
<i>Clostridium cochlearium</i>	5,790	6,439	6,920	11,84	8,497	10,98	2,054	0,023	2,888	5,983	2,933	2,162	0,960
<i>Clostridium gasigenes</i>										0,015			
<i>Clostridium haemolyticum</i>		0,064					0,014		0,063				
<i>Clostridium novyi</i>									0,084				
<i>Clostridium oceanicum</i>		0,064		0,021	0,057		0,014					0,029	
<i>Clostridium perfringens</i>												0,136	
<i>Clostridium sp</i>	0,224	0,487	0,619	0,124	0,568	0,069	0,569	1,242	0,419	0,506	0,168	0,672	0,283
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,547	0,530	1,182	0,187	0,483	0,380	2,304	0,305	3,035	1,667	0,220	4,120	0,031
<i>Clostridium thermopalmarium</i>								0,012					
<i>Clostridium ultunense</i>	2,584	5,507	0,844	15,17	1,250	1,105	0,999	1,464	0,230	0,893	1,917	0,224	2,202
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>										0,015			
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>										0,015			0,016
<i>Cyanobacterium sp</i>													0,016
<i>Enterococcus faecalis</i>													0,079

<i>Enterococcus sp</i>													0,063
<i>Faecalibacterium sp</i>			0,019					0,035				0,049	
<i>Fervidicola ferrireducens</i>				0,021			0,014						
<i>Garciella sp</i>	0,075	0,085	0,038	0,083	0,028	0,069	0,056	0,012		0,060	0,021	0,058	
<i>Geobacter grbiciae</i>												0,010	
<i>Kocuria sp</i>						0,035							
<i>Lactobacillus crispatus</i>				0,041									
<i>Lactobacillus johnsonii</i>													0,047
<i>Leptospira broomii</i>		0,021											
<i>Macrococcus caseolyticus</i>													1,935
<i>Mahella australiensis</i>	0,547	0,360	0,338	0,352	0,426	0,483	0,500	0,340		0,402	0,115	0,273	0,173
<i>Microbacterium aurum</i>		0,021											
<i>Mycobacterium phocaicum</i>													0,016
<i>Propionibacterium acnes</i>								0,012	0,021			0,010	
<i>Propionibacterium sp</i>					0,028								
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>					0,028					0,015			
<i>Pseudomonas sp</i>													
<i>Rhodobacter sp</i>												0,019	
<i>Ruminococcus sp</i>							0,014						0,016
<i>Sarcina sp</i>													0,016
<i>Sphingomonas mucosissima</i>		0,021											
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	77,44	74,26	80,66	53,67	75,87	78,63	81,96	85,45	90,62	81,08	90,80	81,17	92,24
<i>Sporichthya sp</i>						0,035							
<i>Subdoligranulum sp</i>												0,010	
<i>Tepidanaerobacter sp</i>	2,261	1,419	1,219	4,167	0,682		0,791	5,319	0,837	0,253	0,429	0,438	
<i>Thermosediminibacter sp</i>												0,010	
<i>Tissierella creatinophila</i>		0,021							0,021				
<i>Tissierella praeacuta</i>				0,021			0,042	0,023		0,030	0,021		
<i>Tissierella sp</i>	4,448	0,381	1,782	2,218	1,677	1,001	1,277	0,867	0,398	1,697	0,555	1,003	0,220
<i>Verrucomicrobium sp</i>													0,016

Bảng 2. Các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong các quần thể H1, C1, P1, S1 và A1. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	A1	C1	H1	P1	S1	S1-37	S1-50	S1-55	CBP	CB	MF	PB	FE
<i>Bacillus spp.</i>	0,994	0,635	1,969	1,368	0,483		0,763	1,300	0,105	2,485		0,175	0,047
<i>Caloramator spp.</i>	5,045	2,669	4,295	4,063	5,200	5,765	3,608	3,351	0,126	3,378	1,623	3,176	1,369
<i>Clostridium spp.</i>	9,145	20,04	9,565	33,96	15,49	13,95	10,87	3,175	7,848	10,49	6,410	13,58	3,728
<i>Garciella sp.</i>	0,075	0,085	0,038	0,083	0,028	0,069	0,056	0,012		0,060	0,021	0,058	
<i>Mahella australiensis</i>	0,547	0,360	0,338	0,352	0,426	0,483	0,500	0,340		0,402	0,115	0,273	0,173
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	77,44	74,26	80,66	53,67	75,87	78,63	81,96	85,45	90,62	81,08	90,80	81,17	92,25
<i>Tepidanaerobacter sp.</i>	2,261	1,419	1,219	4,167	0,682		0,791	5,319	0,837	0,253	0,429	0,438	
<i>Tissierella spp.</i>	4,448	0,402	1,782	2,239	1,677	1,001	1,318	0,890	0,419	1,726	0,576	1,003	0,220
Khác	0,050	0,127	0,131	0,104	0,142	0,104	0,139	0,164	0,042	0,119	0,021	0,127	2,218
Tổng	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Bảng 3. Hệ số tương quan giữa các tính đa dạng vi khuẩn của các quần thể hỗn hợp được tính từ số liệu thể hiện trong Bảng 1 bằng cách sử dụng phương trình [1].

	A1	C1	H1	P1	S1	S1-37	S1-50	S1-55	CBP	CB	MF	PB	FE
A1	1	0,9970	0,9988	0,9606	0,9982	0,9962	0,9975	0,9951	0,9963	0,9983	0,9977	0,9961	0,9968
C1	0,9970	1	0,9973	0,9722	0,9964	0,9923	0,9953	0,9895	0,9933	0,9944	0,9954	0,9943	0,9940
H1	0,9988	0,9973	1	0,9567	0,9993	0,9981	0,9980	0,9946	0,9975	0,9997	0,9982	0,9972	0,9969
P1	0,9606	0,9722	0,9567	1	0,9607	0,9605	0,9478	0,9428	0,9513	0,9520	0,9533	0,9448	0,9525
S1	0,9982	0,9964	0,9993	0,9607	1	0,9985	0,9955	0,9898	0,9942	0,9976	0,9956	0,9944	0,9936
37	0,9962	0,9923	0,9981	0,9605	0,9985	1	0,9910	0,9898	0,9917	0,9970	0,9933	0,9887	0,9910
50	0,9975	0,9953	0,9980	0,9478	0,9955	0,9910	1	0,9959	0,9982	0,9974	0,9984	0,9994	0,9981
55	0,9951	0,9895	0,9946	0,9428	0,9898	0,9898	0,9959	1	0,9964	0,9948	0,9973	0,9935	0,9995
CBP	0,9963	0,9933	0,9975	0,9513	0,9942	0,9917	0,9982	0,9964	1	0,9982	0,9991	0,9974	0,9988
CB	0,9983	0,9944	0,9997	0,9520	0,9976	0,9970	0,9974	0,9948	0,9982	1	0,9988	0,9959	0,9977
MF	0,9977	0,9954	0,9982	0,9533	0,9956	0,9933	0,9984	0,9973	0,9991	0,9988	1	0,9967	0,9997
PB	0,9961	0,9943	0,9972	0,9448	0,9944	0,9887	0,9994	0,9935	0,9974	0,9959	0,9967	1	0,9961
FE	0,9968	0,9940	0,9969	0,9525	0,9936	0,9910	0,9981	0,9995	0,9988	0,9977	0,9997	0,9961	1

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây thể hiện quy trình và hợp chất theo sáng chế.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết theo một số phương án nhất định của sáng chế, song các ví dụ dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa thêm cho sáng chế và không nhằm làm giới hạn hoặc hạn chế phạm vi hữu hiệu của sáng chế.

Ví dụ 1

Các điều kiện tối ưu để amoni hoá bởi các quần thể hỗn hợp

Để xác định khoảng nhiệt độ tối ưu để amoni hoá bởi các quần thể hỗn hợp, A1, C1, H1, P1 và S1 được nuôi cấy trong môi trường MBM vô trùng [180g bột thịt và xương (MBM) trong mỗi lít nước] ở 50°C (độ Celcius) mà không thông khí trong thời gian 3 ngày. Các hỗn hợp nuôi cấy này, đã đạt đến pha sinh trưởng tĩnh, được sử dụng làm nguyên liệu cấy với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong môi trường MBM với tổng thể tích là 60ml (mililit). Ủ hỗn hợp nuôi cấy đã cấy ở các nhiệt độ khác nhau mà không thông khí trong thời gian 7 ngày.

Quá trình sinh trưởng của các quần thể vi khuẩn hỗn hợp được theo dõi bằng cách đo mức độ tạo amoni của các quần thể. Hàm lượng amoniac tối đa khoảng 8-10 g/lít được xác định lặp đi lặp lại trong quá trình sinh trưởng của hỗn hợp nuôi cấy trong các điều kiện đã được mô tả trên đây. Theo đó, khi nồng độ amoniac đạt đến mức này, thì điều đó được hiểu là sự chuyển pha sang pha sinh trưởng tĩnh. Tính chất đa dạng của các quần thể sẽ hạn chế việc sử dụng các phương pháp dựa trên hỗn hợp nuôi cấy để đếm tế bào, và độ đục của môi trường MBM sẽ ngăn cản việc sử dụng phương pháp đo mật độ quang để đánh giá mật độ tế bào. Trong tất cả các ví dụ dưới đây, “nguyên liệu cấy của các quần thể vi khuẩn hỗn hợp” được dùng để chỉ hỗn hợp nuôi cấy vi khuẩn đã đạt đến pha sinh trưởng tĩnh.

Mức độ amoni hoá được xác định bằng cách đo nồng độ amoniac trong MBM đã cấy bằng bộ thử nghiệm Ammonium Test 1.10024.0001 (Merck KGaA, Darmstadt, Cộng hoà Liên bang Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả này được khẳng định bằng bộ thử nghiệm Ammonia Assay Kit

AA0100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hàm lượng nitơ trong MBM được xác định bằng phương pháp Kjeldahl bởi một phòng thí nghiệm được chứng nhận (Novalab Oy, Karkkila, Phần Lan). Dựa trên kết quả này, hàm lượng amoniac tối đa, tức là nồng độ mà tại đó toàn bộ nitơ trong protein đã được chuyển hoá thành amoniac, được tính. Sau đó, tỷ lệ phần trăm chuyển hoá nitơ, tức là mức độ amoni hoá nitơ trong protein, được tính dựa trên nồng độ amoniac trong các mẫu. Các kết quả được thể hiện trên FIG.1.

Khoảng nhiệt độ tối ưu để amoni hoá bởi A1, C1, H1 và P1 là 37-55°C và bởi S1 là 37-60°C. Tuy nhiên, S1 có khả năng dung nạp nhiệt độ tốt hơn so với A1, C1, H1 và P1 do S1 giữ được một chút hiệu suất amoni hoá của nó ngay cả ở nhiệt độ trong phòng (RT, 23°C) và 70°C.

Để xác định khoảng độ pH tối ưu để amoni hoá bởi các quần thể hỗn hợp, A1, C1, H1, P1, và S1 được nuôi cấy trong môi trường MBM vô trùng [180g MBM trong mỗi lít nước] ở 50°C mà không thông khí trong thời gian 3 ngày. Các hỗn hợp nuôi cấy này được sử dụng làm nguyên liệu cấy với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong môi trường MBM với tổng thể tích là 60ml. Tiếp đó, độ pH của các hỗn hợp nuôi cấy này được điều chỉnh hằng ngày đến giá trị nằm trong khoảng từ 5 đến 12. Ở các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 7 ngày mà không thông khí. Sau đó, tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac được xác định theo phương pháp như đã mô tả trên đây. Các kết quả được thể hiện trên FIG.2.

Khoảng độ pH tối ưu để amoni hoá bởi A1, C1, H1, P1, và S1 là độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9. Tất cả các quần thể C1, P1 và S1 đều cho hiệu suất amoni hoá giảm ở các giá trị độ pH dưới và trên độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 6 đến 9. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng quần thể H1 có khả năng dung nạp độ pH cao tốt hơn so với các quần thể khác, quần thể này thể hiện một chút hoạt tính ở độ pH=11, trong khi A1 có khả năng dung nạp độ pH thấp, quần thể này cũng thể hiện hoạt tính ở độ pH=5.

Để xác định các điều kiện oxy tối ưu để amoni hoá bởi các quần thể hỗn hợp, S1 được nuôi cấy trong môi trường MBM vô trùng [180g MBM trong mỗi lít nước] ở 50°C mà không thông khí trong thời gian 3 ngày. Các hỗn hợp nuôi cấy này được sử dụng làm nguyên liệu cấy với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong môi trường MBM với tổng thể tích là 60ml. Ủ các hỗn hợp nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí (trong bình kỵ khí với AnaeroGen, Oxoid), vi ưa khí (trong lọ với nắp đóng kín), hoặc ưa khí (trong bình Erlenmeyer kết hợp lắc với tốc độ 90 vòng/phút) ở +50°C trong 7 ngày. Tiến hành hai thử nghiệm trên mẫu lặp của từng điều kiện. Mức tạo amoni của hỗn hợp nuôi cấy được đo sau khi nuôi cấy trong thời gian 3 và 7 ngày bằng cách sử dụng kit xác định amoni bằng enzym (Amoniac Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich), và sau đó, tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoni được xác định theo phương pháp như đã mô tả trên đây.

Mức độ tạo amoni của quần thể S1 là không phụ thuộc vào mức oxy của hỗn hợp nuôi cấy. Hiệu suất tạo amoni là 52,5-55,9% ở tất cả các điều kiện oxy, sau 7 ngày nuôi cấy (Bảng 4). Tóm lại, mức độ tạo amoni của quần thể S1 là không phụ thuộc vào mức oxy của môi trường.

Bảng 4. Tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoni bởi quần thể S1 được nuôi cấy trong các điều kiện oxy khác nhau. Các kết quả là giá trị trung bình của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học. Độ lệch chuẩn của ba lần đo lặp lại từ hai mẫu lặp sinh học được thể hiện.

	% N được chuyển hoá thành amoni	
	3 ngày	7 ngày
Kỵ khí	47,6 ± 4,8%	53,6 ± 4,3%
Vi ưa khí	40,9 ± 3,7%	52,5 ± 3,2%
Ưa khí	46,4 ± 8,8%	55,9 ± 5,4%

Kết luận. Đã xác định được khoảng vận hành để amoni hoá các nguyên liệu protein bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp. Nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 37-55°C và độ pH nằm trong

khoảng từ 5 đến 11, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 9, là tốt nhất để amoni hoá bằng vi khuẩn bởi các quần thể được mô tả ở đây. Quá trình amoni hoá diễn ra trong điều kiện kỵ khí, vi ưa khí, và ưa khí bằng cách sử dụng các quần thể hỗn hợp này.

Ví dụ 2

Mức độ amoni hoá gia tăng của các nguyên liệu hữu cơ

Các quần thể vi khuẩn hỗn hợp H1, C1, P1, S1, và A1 được sử dụng để amoni hoá nitơ trong protein trong các nguyên liệu hữu cơ khác nhau, tức là nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật và thực vật, như được xác định dưới đây.

MBM có nguồn gốc từ động vật. Các MBM (dưới đây lần lượt được ký hiệu là MBM1 và MBM2 được sản xuất từ sản phẩm phụ của động vật theo các phương pháp được mô tả trong Quy chế số 142/2011 của Ủy ban châu Âu, và bao gồm nguyên liệu có nguy cơ nhiễm khuẩn thấp loại 3 (Quy chế số 1069/2009 của Ủy ban châu Âu). Cụ thể, MBM1 được mua từ Findest Protein Oy, Phần Lan, và MBM2 được mua từ SARIA Bio-Industries AG & Co. KG, Cộng hoà Liên bang Đức. Bột lông vũ được mua từ Findest Protein Oy, Phần Lan, và bột cá là sản phẩm của Ba Lan được mua từ Henry Teirs Ltd, Phần Lan.

Các nguyên liệu tươi có nguồn gốc từ động vật. Sản phẩm phụ tươi thu được khi giết mổ có nguồn gốc từ gà giò và bò/lợn được sử dụng. Sản phẩm phụ của gà giò bao gồm ruột, mề, gan, tim, đầu, huyết, ngón chân, xương, đốt sống cổ, da cổ, và mỡ nội tạng. Sản phẩm phụ của bò/lợn bao gồm da, thịt, sụn, xương sụn, ruột non, tim, phổi, thận, gan, và mỡ lợn; và thịt, xương sụn, khí quản, phổi, mỡ, và sách bò. Sản phẩm phụ của cá bao gồm chất thải từ cá bao gồm xương, thịt, da và nội tạng. Lông vũ nghiền là lông vũ đã rửa và nghiền đến cỡ hạt $\leq 2\text{cm}$. Huyết bò là huyết đông lạnh loại thực phẩm. Tất cả các nguyên liệu từ cá, gia cầm, lợn và bò đều có nguồn gốc từ Phần Lan.

Nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật. Dịch ngâm etanol sinh học (St1 Oy, Phần Lan) là chất thải lên men thu được từ quá trình sản xuất etanol sinh

học, Sinh khối lúa mạch (Senson Oy, Phần Lan) là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất nước ủ men, và dịch ngâm lúa mạch (Senson Oy, Phần Lan) là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất enzym lúa mạch. Sinh khối lúa mì (CropEnergies AG, Cộng hoà Liên bang Đức) và bã cải dầu (Mildola Oy, Phần Lan) là nguyên liệu dùng làm thức ăn cho động vật.

Các nguyên liệu tươi có nguồn gốc từ động vật được sử dụng dưới dạng thể đồng nhất chứa 40% (trọng lượng/thể tích) và bột có nguồn gốc từ động vật và nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật được sử dụng với nồng độ 180 g/lít. Thể đồng nhất và dung dịch được điều chế trong nước máy với tổng thể tích là 60ml. Độ pH thể đồng nhất và dung dịch được điều chỉnh đến độ pH=7 bằng NaOH nếu độ pH ban đầu nhỏ hơn 7. Ngoài ra, các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật như dịch ngâm lúa mạch, bã cải dầu, sinh khối lúa mì, và sinh khối lúa mạch hàng ngày cần được điều chỉnh độ pH đến 7 sau khi cấy do độ pH trong các nguyên liệu này bị giảm đến giá trị dưới khoảng tối ưu để amoni hoá bởi các quần thể hỗn hợp. Không cần điều chỉnh độ pH của dịch ngâm etanol sinh học và tất cả các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật sau khi cấy.

Các quần thể vi khuẩn H1, C1, P1, S1, và A1 được nuôi cấy trong môi trường vô trùng [180g MBM trong mỗi lít nước] ở 50°C mà không thông khí trong thời gian 3 ngày. Các hỗn hợp nuôi cấy này được sử dụng làm nguyên liệu cấy với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong thể đồng nhất và dung dịch chứa nguyên liệu hữu cơ. Ủ nguyên liệu được cấy và mẫu đối chứng không được cấy ở nhiệt độ 50°C mà không thông khí.

Mức độ amoni hoá được xác định bằng cách đo nồng độ amoniac trong các nguyên liệu hữu cơ đã cấy bằng bộ thử nghiệm Ammonium Test 1.10024.0001 (Merck KGaA, Darmstadt, Cộng hoà Liên bang Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả này được khẳng định bằng bộ thử nghiệm Ammonia Assay Kit AA0100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hàm lượng nitơ trong các nguyên liệu hữu cơ được xác định bằng phương pháp Kjeldahl bởi một phòng thí nghiệm được chứng nhận (Novalab

Oy, Karkkila, Phần Lan). Dựa trên kết quả này, hàm lượng amoniac tối đa, tức là nồng độ mà tại đó toàn bộ nitơ trong protein đã được chuyển hoá thành amoniac, được tính cho mỗi nguyên liệu hữu cơ. Sau đó, tỷ lệ phần trăm chuyển hoá nitơ, tức là mức độ amoni hoá nitơ trong protein, được tính dựa trên nồng độ amoniac trong các mẫu. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Kết luận. Kết quả thu được cho thấy mức độ amoni hoá gia tăng bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp H1, C1, P1, S1, và A1 khi so sánh với mẫu đối chứng không được cấy. Các quần thể vi khuẩn nội sinh là nguyên nhân gây ra quá trình amoni hoá ở một mức độ nhất định, đặc biệt là ở các nguyên liệu tươi có nguồn gốc từ động vật, nhưng quá trình này được đẩy nhanh nhờ các quần thể hỗn hợp. Các nguyên liệu trên cơ sở thực vật thể hiện hoạt tính amoni hoá nội sinh ở mức rất thấp trong các điều kiện được sử dụng, và lợi ích chủ yếu đến từ các quần thể được cấy.

Các quần thể H1 và S1 dường như là các quần thể có hiệu suất amoni hoá cao nhất. Quần thể S1 là quần thể tạo amoni tốt nhất đối với sản phẩm phụ của cá, bột cá, và MBM2. Quần thể H1 là quần thể tạo amoni tốt nhất đối với sản phẩm phụ của lợn/bò, MBM1, và dịch ngâm etanol sinh học. Các quần thể S1 và H1 không phải là quần thể tạo amoni kém nhất đối với nguyên liệu bất kỳ.

Các hình vẽ từ FIG3A đến FIG. 3H minh họa hiệu suất amoni hoá các nguyên liệu hữu cơ khác nhau bởi các quần thể hỗn hợp H1, C1, P1, S1, và A1. Các nguyên liệu hữu cơ là: FIG.3A: Sản phẩm phụ của cá, FIG.3B: Sản phẩm phụ của gà giò, FIG.3C: Sản phẩm phụ của bò/lợn, FIG.3D: Dịch ngâm etanol sinh học, FIG.3E: Bột thịt và xương 1, FIG.3F: Bột thịt và xương 2, FIG.3G: Bột cá, FIG.3H: Bột lông vũ. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac, tức là hiệu suất amoni hoá sau khi ủ ở 50°C trong những khoảng thời gian khác nhau. Quần thể S1 là đáng chú ý nhất do nó có khả năng amoni hoá các nguyên liệu lần lượt được thể hiện trên FIG.3A, 3D và 3G, một cách hữu hiệu, trong khi H1 có khả năng amoni hoá nhanh các nguyên liệu lần lượt được thể hiện trên FIG.3A, 3C, 3D và 3E. Nói

chung, tất cả năm quần thể đều làm tăng hiệu suất amoni hoá so với mẫu đối chứng không được cấy. Tác dụng này là đặc biệt rõ rệt ở các nguyên liệu được thể hiện trên FIG.3C, 3D, 3E, và 3F. FIG.3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G và 3H thể hiện kết quả đối với các nguyên liệu lần lượt được thể hiện trên FIG.3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G và 3H.

Bảng 5. Hiệu suất chuyển hoá nitơ thành amoniac được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với giá trị tối đa. Tiến hành xác định tại thời điểm 24 giờ từ khi cấy đối với sản phẩm phụ của cá, gà giò, và lợn/bò và bột cá, 48 giờ từ khi cấy đối với bột thịt và xương, và 168 giờ (7 ngày) từ khi cấy đối với bột lông vũ, lông vũ nghiền, huyết và tất cả các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật. Các mẫu đối chứng của nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật không được điều chỉnh độ pH.

Nguyên liệu/Quần thể		Mẫu đối chứng	H1	C1	P1	S1	A1
Nguyên liệu tươi từ động vật	Sản phẩm phụ của cá	14,9 ± 2,1	44,2 ± 8,0	31,5 ± 5,4	37,1 ± 6,0	55,9 ± 7,6	28,8 ± 2,6
	Sản phẩm phụ của gà giò	32,7 ± 3,3	45,4 ± 6,6	41,6 ± 6,1	40,4 ± 4,3	40,8 ± 5,9	49,8 ± 9,7
	Sản phẩm phụ của lợn/bò	23,1 ± 2,8	67,2 ± 6,6	45,6 ± 2,2	46,4 ± 3,6	44,9 ± 5,8	35,6 ± 5,0
	Lông vũ nghiền	43,6 ± 3,4	không xác định được	không xác định được	không xác định được	50,1 ± 5,4	không xác định được
	Huyết bò	<0,5	13,1 ± 3,0	34,6 ± 4,3	23,1 ± 4,4	35,2 ± 5,3	11,9 ± 4,3
Bột động vật	Bột lông vũ	14,4 ± 3,1	26,8 ± 4,9	30,4 ± 5,9	23,9 ± 3,7	29,7 ± 4,2	19,1 ± 3,5
	Bột cá	8,2 ± 1,1	20,7 ± 1,8	12,5 ± 1,8	16,9 ± 1,9	21,9 ± 2,3	10,9 ± 1,4
	MBM1	3,9 ± 3,4	73,2 ± 13,8	29,9 ± 4,3	60,0 ± 14,6	53,4 ± 10,6	41,5 ± 6,5
	MBM2	15,5 ± 3,0	48,9 ± 11,0	45,4 ± 5,7	50,7 ± 9,8	54,7 ± 10,9	52,2 ± 10,8

Nguyên liệu từ thực vật	Dịch ngâm ethanol sinh học	10,9 ± 2,3	103,7 ± 14,1	84,3 ± 18,2	83,5 ± 10,0	102,5 ± 16,7	80,4 ± 10,8
	Dịch ngâm lúa mạch	2,1 ± 1,7	không xác định được	không xác định được	không xác định được	61,0 ± 8,4	không xác định được
	Bã cải dầu	2,5 ± 0,6	45,7 ± 6,7	64,1 ± 10,2	không xác định được	51,8 ± 6,5	58,3 ± 13,6
	Sinh khối lúa mì	3,9 ± 1,5	43,9 ± 8,7	48,5 ± 8,6	không xác định được	39,1 ± 10,1	40,1 ± 6,4
	Sinh khối lúa mạch	21,6 ± 3,1	không xác định được	không xác định được	không xác định được	61,6 ± 10,1	không xác định được

Ví dụ 3

Amoni hoá nguyên liệu hữu cơ hỗn hợp (tác dụng của hàm lượng hydrat cacbon đối với quá trình amoni hoá)

Đường. tác dụng của việc bổ sung glucoza hoặc tinh bột đối với quá trình tạo amoniac của quần thể S1 được thử nghiệm trên môi trường chứa sản phẩm phụ của gà với hàm lượng 40% (trọng lượng/thể tích). Bổ sung glucoza hoặc tinh bột vào môi trường với nồng độ 1%, 5% và 10%. Thêm quần thể S1 (được nuôi cấy trong môi trường MBM 180 g/lít) vào dưới dạng nguyên liệu cấy với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong 60ml các môi trường khác nhau, và ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ +50°C trong 2 ngày. Hai thử nghiệm trên mẫu lặp với từng môi trường được thực hiện. Mức độ tạo amoni được đo sau thời gian nuôi cấy 2 ngày bằng cách sử dụng kit xác định amoniac bằng enzym (Amoniacy Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich).

Kết quả. Mức độ tạo amoniac bởi quần thể S1 bị tác động tiêu cực khi bổ sung đường vào môi trường (Bảng 6). Khi không bổ sung hydrat cacbon, hiệu suất tạo amoniac là 60% sau 2 ngày nuôi cấy. Việc bổ sung glucoza vào môi trường làm giảm hiệu suất tạo amoniac đến 34-48%. Việc bổ sung tinh bột với nồng độ 1% không làm giảm hiệu suất tạo amoniac, nhưng việc bổ sung

tinh bột với nồng độ 5% và 10% lần lượt làm giảm hiệu suất tạo amoniac đến 45% và 37%. Hiệu suất tạo amoniac thấp có liên quan đến độ pH giảm trong các môi trường. Tóm lại, mức độ tạo amoni của quần thể S1 bị tác động tiêu cực khi thêm đường vào môi trường sinh trưởng.

Bảng 6. Tác dụng của việc bổ sung đường hoặc tinh bột đối với quá trình tạo amoniac của quần thể S1 trong môi trường chứa sản phẩm phụ của gà với hàm lượng 40% được thử nghiệm. Mức độ tạo amoni được đo sau thời gian nuôi cấy 2 ngày ở nhiệt độ +50°C. Các kết quả là giá trị trung bình của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học. Độ lệch chuẩn của ba lần đo lặp lại từ cả hai mẫu lặp sinh học được thể hiện.

	Hiệu suất tạo amoniac	Độ pH
1% glucoza	48,2 ± 7,8%	7,0
5% glucoza	34,9 ± 7,9%	5,8
10% glucoza	34,3 ± 5,4%	6
1% tinh bột	61,6 ± 7,3%	7,3
5% tinh bột	45,2 ± 7,0%	6,3
10% tinh bột	36,6 ± 5,1%	5,5
Không có đường	59,7 ± 11,1%	7,3

Các nguyên liệu hữu cơ hỗn hợp. Quần thể S1 được sử dụng để amoni hoá hỗn hợp gồm các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật và động vật. Các môi trường nuôi cấy chứa 5% trọng lượng khô được điều chế. Môi trường chứa các nguyên liệu dưới đây, một nguyên liệu tại một thời điểm hoặc hai nguyên liệu với tỷ lệ 50% + 50%: các sản phẩm phụ của gà đã được nghiền (200 g/lít riêng rẽ, 100 g/lít với hỗn hợp 50-50), các sản phẩm phụ của cá đã được nghiền (200 g/lít riêng rẽ, 100 g/lít với hỗn hợp 50-50), bột tảo *Chlorella* sấy khô (50 g/lít riêng rẽ, 25 g/lít với hỗn hợp 50-50), và sinh khối lúa mạch (50 g/lít riêng rẽ, 25 g/lít với hỗn hợp 50-50). Ngoài ra, sinh khối lúa mạch cũng được phối

hợp với các tỷ lệ khác nhau với các sản phẩm phụ của gà và cá, sao cho tổng hàm lượng trọng lượng khô của môi trường luôn là 5%. Các nguyên liệu chứa nitơ là như sau: gà 22,2 g/kg, cá 30,4 g/kg, *Chlorella* 113,6 g/kg, và lúa mạch 24,6 g/kg. Cây 7,5ml quần thể S1 được nuôi cấy trong môi trường MBM (180 g/lít) vào 150ml từng môi trường. Hai thử nghiệm trên mẫu lặp của từng môi trường được tiến hành. Ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ +50°C và mức độ tạo amoni của hỗn hợp nuôi cấy được đo sau 4 hoặc 7 ngày nuôi cấy bằng cách sử dụng kit định lượng amoniac bằng cách xác định enzym (Amoniac Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich) cho các mẫu sinh học theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả (I). Amoni được tạo ra ở tất cả các nguyên liệu được thử nghiệm và hỗn hợp của chúng. Nitơ được chuyển hoá thành amoniac ở mức cao nhất (hiệu suất tạo amoniac là cao nhất) trong các môi trường chứa nguyên liệu từ động vật, tức là gà và cá (72-78%). Trong các môi trường chứa nguyên liệu từ thực vật, tức là *Chlorella* và lúa mạch, hiệu suất thu được là thấp hơn (Bảng 7). Khi tất cả 4 nguyên liệu được phối hợp trong một môi trường với tỷ lệ 25% + 25% + 25% + 25%, thì hiệu suất tạo amoniac là $67,5 \pm 6,7\%$ trong 4 ngày.

Bảng 7. Mức độ tạo amoniac của quần thể S1 trong các môi trường chứa nguyên liệu khác nhau và hỗn hợp của chúng trong 4 ngày. Các kết quả là giá trị trung bình của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học. Độ lệch chuẩn của ba lần đo lặp lại từ hai mẫu lặp sinh học được thể hiện.

	Gà	Cá	<i>Chlorella</i>	Sinh khối lúa mạch
Gà	$78,1 \pm 16,6\%$			
Cá	$71,9 \pm 7,9\%$	$80,2 \pm 4,5\%$		
<i>Chlorella</i>	$59,2 \pm 9,3\%$	$59,6 \pm 5,4\%$	$36,0 \pm 9,7\%$	
Sinh khối lúa mạch	$37,3 \pm 11,1\%$	$66,2 \pm 17,1\%$	$25,7 \pm 7,6\%$	$23,8 \pm 5,4\%$ (7 ngày nuôi cấy)

Hiệu suất thu được trong các môi trường chứa lúa mạch gia tăng khi bổ sung bazơ vào môi trường trong quá trình nuôi cấy. Khi độ pH của hỗn hợp

nuôi cấy được giữ ở mức 7-8 bằng cách thêm NaOH vào hỗn hợp nuôi cấy (khi bắt đầu và sau 1, 4, 5, và 6 ngày nuôi cấy), thì hiệu suất tạo amoniac sau 4 ngày nuôi cấy là như sau: $54,5 \pm 9,0\%$ trong các môi trường chứa gà và lúa mạch, $35,6 \pm 4,4\%$ trong các môi trường chứa *Chlorella* và lúa mạch, và $61,2 \pm 7,1\%$ trong môi trường lúa mạch (sau 7 ngày nuôi cấy). Khi tham khảo các kết quả về tác động tiêu cực của việc bổ sung hydrat cacbon đối với quá trình amoni hoá, hiệu ứng axit hoá của lúa mạch có thể là kết quả của hàm lượng hydrat cacbon cao hơn của nó so với các nguyên liệu từ động vật.

Kết quả (II). Sinh khối lúa mạch cũng được phối hợp với sản phẩm phụ của gà và sản phẩm phụ của cá với các tỷ lệ khác nhau để xác định xem có thể tránh được hiệu ứng axit hoá của lúa mạch bằng cách bổ sung các nguyên liệu từ động vật vào môi trường với lượng đủ. Các thử nghiệm này được thực hiện với thể tích 60ml.

Bảng 8 cho thấy rằng trong môi trường chứa các sản phẩm phụ của gà, tỷ lệ tối đa của lúa mạch trong môi trường này 30% và sau đó, độ pH giảm xuống mức dưới 5 và hiệu suất tạo amoniac tối đa là 21%. Trong môi trường chứa các sản phẩm phụ của cá, hiệu suất tạo amoniac giảm đáng kể khi có ít hơn 40% cá trong môi trường, và độ pH cũng giảm xuống mức dưới 5.

Bảng 8. Mức độ tạo amoniac của quần thể S1 trong các môi trường chứa nguyên liệu khác nhau và hỗn hợp của chúng trong 3 ngày. Các kết quả là giá trị trung bình của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học. Độ lệch chuẩn của ba lần đo lặp lại từ hai mẫu lặp sinh học được thể hiện.

	Hiệu suất tạo amoniac (%)	Độ pH
100% gà	$60,3 \pm 10,9$	6,5
90% gà + 10% lúa mạch	$69,0 \pm 6,8$	6,4
80% gà + 20% lúa mạch	$35,3 \pm 13,2$	6,1
70% gà + 30% lúa mạch	$49,3 \pm 4,1$	5,7
60% gà + 40% lúa mạch	$20,8 \pm 2,3$	4,5
50% gà + 50% lúa mạch	$20,7 \pm 2,1$	4,3

100% cá	79,1 ± 4,4	6,7
80% cá + 20% lúa mạch	85,0 ± 12,5	6,8
60% cá + 40% lúa mạch	81,9 ± 11,0	6,4
50% cá + 50% lúa mạch	87,2 ± 10,4	6,1
40% cá + 60% lúa mạch	73,1 ± 5,4	5,8
30% cá + 80% lúa mạch	33,0 ± 6,5	4,9
20% cá + 80% lúa mạch	36,9 ± 6,2	4,4

Amoni hoá chất thải thực phẩm cùng với nguyên liệu từ động vật. Các hỗn hợp chứa chất thải từ cá đã được nghiền và chất thải thực phẩm đã được nghiền cũng được amoni hoá bởi quần thể S1. Môi trường chứa 40g nguyên liệu trong thể tích 100ml được điều chế từ chất thải từ cá với hàm lượng nitơ là 27,1 g/kg và chất thải thực phẩm với hàm lượng nitơ là 10,1 g/kg. Chất thải thực phẩm chứa cả nguyên liệu từ thực vật lẫn động vật. Môi trường được điều chỉnh đến độ pH=7 trung tính. Thêm quần thể S1 được nuôi cấy trong môi trường MBM (180 g/lít) vào dưới dạng nguyên liệu cấy có hàm lượng 5% (thể tích/thể tích) trong 60ml từng môi trường. Ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ +50°C và mức độ tạo amoni của hỗn hợp nuôi cấy được đo sau 3 ngày nuôi cấy bằng cách sử dụng kit xác định amoniac bằng enzym (Amoni Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich).

Kết quả. Quần thể S1 chuyển hoá 55-72% nitơ trong môi trường thành amoni trong các môi trường chứa ít nhất 60% chất thải từ cá và chứa tối đa 40% chất thải thực phẩm (Bảng 9). Nếu có 50% chất thải từ cá hoặc hoặc ít hơn trong môi trường, thì độ pH của hỗn hợp nuôi cấy giảm xuống 5 hoặc thấp hơn, và hiệu suất tạo amoniac giảm đến mức 8-16%. Trong Ví dụ 3, cũng đã chứng minh được rằng việc bổ sung hydrat cacbon vào môi trường gây axit hoá môi trường và nó cũng có tác động tiêu cực đối với quá trình amoni hoá. Hàm lượng hydrat cacbon cao trong chất thải thực phẩm có thể là lý do dẫn đến tình

trạng axit hoá môi trường đã quan sát được, nếu tỷ lệ của nó trong môi trường là quá cao, thì tức là tỷ lệ này lớn hơn 40%.

Bảng 9. Mức độ tạo amoniac và độ pH của quần thể S1 được nuôi cấy trong các môi trường chứa tỷ lệ khác nhau của cá và chất thải thực phẩm trong 3 ngày. Độ lệch chuẩn của ba lần đo lặp lại được thể hiện.

Môi trường	Hiệu suất tạo amoniac (%)	Độ pH
100% cá	$61,0 \pm 5,8$	7,5
90% cá - 10% thực phẩm	$59,9 \pm 3,2$	7,5
80% cá - 20% thực phẩm	$55,5 \pm 2,2$	7,3
70% cá - 30% thực phẩm	$57,8 \pm 5,0$	7,3
60% cá - 40% thực phẩm	$72,2 \pm 2,7$	7,0
50% cá - 50% thực phẩm	$16,1 \pm 0,6$	5,0
40% cá - 60% thực phẩm	$13,6 \pm 0,8$	5,0
30% cá - 70% thực phẩm	$7,7 \pm 0,3$	4,5
20% cá - 80% thực phẩm	$8,3 \pm 0,8$	4,5
10% cá - 90% thực phẩm	$7,7 \pm 1,2$	4,5
100% thực phẩm	$8,8 \pm 1,2$	4,5

Kết luận. Hỗn hợp gồm các nguyên liệu khác nhau được amoni hoá bằng cách sử dụng quần thể S1. Nói chung, nguyên liệu từ thực vật được amoni hoá với hiệu suất thấp hơn so với nguyên liệu từ động vật. Mặc dù không bị ràng buộc vào giả thuyết hoặc lý thuyết của sáng chế, song hiện tượng này có thể được giải thích bởi tình trạng axit hoá môi trường trong quá trình nuôi cấy. Có thể tránh được tình trạng axit hoá môi trường bằng cách bổ sung bazơ vào hỗn hợp nuôi cấy. Ngoài ra, nếu nguyên liệu từ thực vật và động vật được phối hợp với tỷ lệ thích hợp, thì sẽ tránh được tình trạng axit hoá và thu được hiệu suất tạo amoniac cao hơn.

Ví dụ 4

Amoni hoá trên quy mô sản xuất thử

Khả năng amoni hoá nguyên liệu tươi từ động vật của quần thể vi khuẩn S1 được chứng minh trên quy mô sản xuất 20-25 lít. Các thùng đóng kín có dung tích 30 lít, mỗi thùng có hệ thống kiểm soát nhiệt độ và cơ cấu khuấy, được sử dụng cho các quy trình lên men hoặc nuôi cấy này. Môi trường sinh trưởng là hỗn dịch 20% được điều chế từ sản phẩm phụ của gà giò hoặc sản phẩm phụ của cá. Trong một phần của các thử nghiệm, thêm nguyên liệu cấy chứa quần thể S1 với hàm lượng 2,5% hoặc 5% (thể tích/thể tích) được nuôi cấy trong môi trường MBM 180 g/lít vào hỗn hợp nuôi cấy. Ủ hỗn hợp nuôi cấy kết hợp khuấy đều với tốc độ vừa phải ở $+37^{\circ}\text{C}$ hoặc $+50^{\circ}\text{C}$ trong 2-3 ngày. Mức độ tạo amoniac được đo hằng ngày bằng cách sử dụng kit xác định amoniac bằng enzym (Amoniac Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich).

Kết quả. Khi các sản phẩm phụ của gà được ủ ở nhiệt độ $+50^{\circ}\text{C}$ với thể tích 20 lít, việc thêm nguyên liệu cấy S1 với hàm lượng 5% vào hỗn hợp nuôi cấy được thấy là làm tăng hiệu suất tạo amoniac ở mức đáng kể (FIG.4), từ 5% đến 72% trong 40,5 giờ. Với các sản phẩm phụ của cá, với thể tích 25 lít, việc thêm nguyên liệu cấy S1 với hàm lượng 2,5% vào có tác dụng làm tăng hiệu suất tạo amoniac từ 71% đến 91% trong 39,5 giờ, khi ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ $+50^{\circ}\text{C}$.

Trong các quy trình lên men hoặc nuôi cấy sản phẩm phụ của cá với quần thể S1, nhiệt độ nuôi cấy là $+37^{\circ}\text{C}$ và $+50^{\circ}\text{C}$ được so sánh. Sau 24 giờ nuôi cấy, hiệu suất tạo amoniac là cao hơn, cụ thể là $80 \pm 6\%$, ở nhiệt độ $+50^{\circ}\text{C}$ và thấp hơn, cụ thể là $58 \pm 6\%$ ở nhiệt độ $+37^{\circ}\text{C}$. Điều đó khẳng định rằng nhiệt độ $+50^{\circ}\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp để amoni hoá các nguyên liệu protein bằng quần thể vi khuẩn S1.

Kết luận. Thu được các kết quả này ở quy mô sản xuất 20-25 lít, điều đó giúp khẳng định các kết quả của Ví dụ 2, trong đó cho thấy rằng việc thêm quần thể vi khuẩn vào có tác dụng làm tăng hiệu suất tạo amoniac trong các môi trường chứa nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật.

Ví dụ 5

Gây cảm ứng các quần thể hỗn hợp từ bột thịt và xương

Quần thể A1 được tạo ra như sau: Nuôi cấy *Aspergillus oryzae* CECT 2095 trên aga chứa dextroza khoai tây (môi trường ATCC medium 336, công thức điều chế là như sau: Đun sôi 300 gam khoai tây đã được thái mịn trong 500ml nước cho đến khi chín kỹ. Lọc và thêm nước vào dịch lọc đến 1000ml. Thêm 20g glucoza và 15g aga vào, và hấp trong nồi hấp ở nhiệt độ 121°C) trong thời gian khoảng 7 ngày. Rót ba mililit môi trường lỏng chứa dextroza khoai tây (được điều chế theo phương pháp giống như phương pháp điều chế aga chứa dextroza khoai tây nhưng không bổ sung aga) vào hỗn hợp nuôi cấy *A. oryzae* trên aga, và chuyển hỗn dịch thu được vào 100ml môi trường dextroza khoai tây. Ủ hỗn hợp nuôi cấy nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc nhẹ trong 3 ngày. Tiếp đó, môi trường chứa MBM1 ở trạng thái rắn được điều chế bằng cách trộn 36g MBM1 không vô trùng với 50ml nước máy. Cấy 10ml hỗn hợp nuôi cấy lỏng chứa *A. oryzae* trên môi trường ở trạng thái rắn, và ủ hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ +30°C trong 16 ngày. Sau đó, thêm nước vào hỗn hợp nuôi cấy để thu được nồng độ 180g MBM trong mỗi lít nước. Ủ hỗn hợp nuôi cấy dạng lỏng này ở nhiệt độ +50°C trong 4 ngày.

Quần thể C1 được tạo ra bằng cách trộn MBM1 không vô trùng với nước máy lạnh với tỷ lệ 180g MBM trong mỗi lít nước. MBM được nuôi cấy mà không thông khí ở 50°C cho đến khi thu được nồng độ NH₃ ở mức cân bằng, và đạt đến pha sinh trưởng tĩnh như được giải thích trong Ví dụ 1.

Quần thể H1 được tạo ra bằng cách trộn MBM1 không vô trùng với nước máy đang sôi với tỷ lệ 180g MBM trong mỗi lít nước. Để nguội hỗn hợp thu được đến nhiệt độ trong phòng. MBM được nuôi cấy mà không thông khí ở 50°C cho đến khi thu được nồng độ NH₃ ở mức cân bằng, và đạt đến pha sinh trưởng tĩnh như được giải thích trong Ví dụ 1.

Quần thể P1 được tạo ra bằng cách trộn MBM1 không vô trùng với nước máy lạnh với tỷ lệ 45g MBM trong mỗi lít nước. Hỗn hợp thu được được

đệm đến độ pH=9 bằng dung dịch MOPS 20mM, và được nuôi cấy mà không thông khí ở 50°C. Tiếp đó, hỗn hợp nuôi cấy đã đạt đến pha sinh trưởng tĩnh được sử dụng để cấy vào môi trường MBM1 vô trùng, và được nuôi cấy mà không thông khí ở 50°C cho đến khi đạt đến pha sinh trưởng tĩnh. Quá trình cấy và nuôi cấy được lặp lại bảy lần. Theo đó, P1 là thế hệ thứ 8 của quần thể MBM1 ban đầu.

Quần thể S1 được tạo ra bằng cách trộn MBM2 không vô trùng với nước máy lạnh với tỷ lệ 180g MBM trong mỗi lít nước. MBM được nuôi cấy mà không thông khí ở 50°C cho đến khi thu được nồng độ NH₃ ở mức cân bằng, và đạt đến pha sinh trưởng tĩnh như được giải thích trong Ví dụ 1.

Tất cả các quần thể được duy trì bằng cách bảo quản hỗn hợp nuôi cấy dạng lỏng ở nhiệt độ +4°C. Hỗn hợp nuôi cấy này được sử dụng để cấy hỗn hợp nuôi cấy được sử dụng trong các ví dụ từ Ví dụ 1 đến Ví dụ 6.

Tác dụng của nhiệt độ. Để xác định nhiệt độ tối ưu để làm giàu các quần thể vi khuẩn amoni hoá từ MBM không vô trùng, các môi trường MBM không vô trùng (180g MBM1 hoặc MBM2 trong mỗi lít nước máy lạnh) được điều chế và đệm đến độ pH=7,5-8 bằng dung dịch MOPS 20mM. Ủ môi trường này ở các nhiệt độ khác nhau nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng (RT) đến 80°C trong 7 ngày mà không thông khí. Nồng độ NH₃ được xác định theo phương pháp như được giải thích trong Ví dụ 1. Các kết quả được thể hiện trên FIG.5.

Kết quả. Nhiệt độ tối ưu để gây cảm ứng một quần thể trên MBM1 là 50°C (FIG.5). Nhiệt độ thấp hơn một chút, 45°C, dường như là ở các quần thể từ ưa nhiệt trung bình đến ưa nhiệt như quan sát được từ độ lệch cao giữa các kết quả thu được ở nhiệt độ này. Một số mẫu lặp sinh học có hiệu suất chuyển hoá nitơ cao, trong khi một số mẫu có mức thu hồi thấp. Quần thể ưa nhiệt có giá trị tối ưu rõ rệt ở nhiệt độ 55°C, quần thể này không được gây cảm ứng trong tất cả các mẫu lặp sinh học. MBM2 có khả năng cao để gây cảm ứng quần thể trong một khoảng nhiệt độ rộng, từ nhiệt độ trong phòng đến 70°C.

Quần thể MBM2 có hoạt tính amoni hoá trong một khoảng nhiệt độ rộng hơn so với quần thể MBM1.

Tác dụng của độ pH. Để xác định độ pH tối ưu để làm giàu các quần thể vi khuẩn amoni hoá từ MBM không vô trùng, các môi trường MBM không vô trùng (180g MBM trong mỗi lít nước) được điều chế và độ pH của chúng được điều chỉnh ở các mức khác nhau (độ pH=5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12) hoặc không được điều chỉnh. Ở các môi trường này ở nhiệt độ +50°C trong 7 ngày mà không thông khí. Trong quá trình nuôi cấy, trong một thử nghiệm, độ pH được điều chỉnh ở mức ban đầu vào ngày thứ 1, 2, 3, và 4. Trong một thử nghiệm khác, độ pH không được điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy. Bột thịt và xương mua được từ hai nhà sản xuất khác nhau (MBM1 và MBM2) được thử nghiệm.

Kết quả. Khoảng độ pH tối ưu để làm giàu các quần thể amoni hoá từ MBM1 là 7-9, nếu độ pH của hỗn hợp nuôi cấy được điều chỉnh hằng ngày (Bảng 10). Nếu độ pH chỉ được điều chỉnh vào thời điểm bắt đầu nuôi cấy, thì khoảng độ pH tối ưu là 8-11. Đối với MBM2, khoảng độ pH tối ưu là 6-9, nếu độ pH được điều chỉnh hằng ngày. Nếu độ pH chỉ được điều chỉnh tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm, thì tất cả độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 11 đều có hiệu quả tốt tương tự nhau để làm giàu các vi khuẩn amoni hoá.

Bảng 10. Tác dụng của độ pH của hỗn hợp nuôi cấy đối với việc làm giàu các quần thể vi khuẩn amoni hoá từ MBM1 và MBM2 không vô trùng. Độ pH của hỗn hợp nuôi cấy được điều chỉnh tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm hoặc điều chỉnh hằng ngày. Độ lệch chuẩn của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học và ba lần đo lặp kỹ thuật của mỗi mẫu được thể hiện.

MBM1		MBM2	
Độ pH được điều chỉnh tại thời điểm bắt đầu thử	Độ pH được điều chỉnh hằng	Độ pH được điều chỉnh tại	Độ pH được điều chỉnh hằng

	thử nghiệm	ngày	thời điểm bắt đầu thử nghiệm	ngày
Độ pH=5	13,1 ± 1,1	1,1 ± 0,7	38,3 ± 2,6	5,6 ± 0,5
Độ pH=6	26,6 ± 9,8	25,8 ± 5,9	38,0 ± 5,6	36,6 ± 3,5
Độ pH=7	37,1 ± 11,5	42,9 ± 4,1	37,6 ± 2,0	47,9 ± 3,9
Độ pH=8	67,4 ± 7,7	55,5 ± 4,6	44,4 ± 5,8	56,2 ± 5,1
Độ pH=9	71,3 ± 1,8	41,2 ± 4,0	39,7 ± 5,8	51,2 ± 1,7
Độ pH=10	60,0 ± 7,4	11,1 ± 0,5	41,3 ± 5,9	9,0 ± 1,2
Độ pH=11	51,7 ± 4,7	0,9 ± 0,1	45,6 ± 2,9	1,5 ± 0,2
Độ pH=12	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,2	17,0 ± 1,0	1,5 ± 0,2
Không điều chỉnh độ pH	43,8 ± 12,9		42,0 ± 8,4	

Kết luận. Các quần thể hỗn hợp có thể được gây cảm ứng bột thịt và xương từ hai nhà sản xuất khác nhau. Các quần thể được gây cảm ứng ở các nhiệt độ khác nhau, song giá trị tối ưu thay đổi giữa các mẫu MBM. Nếu độ pH được duy trì ở mức nhỏ hơn 6 hoặc lớn hơn 9, thì việc gây cảm ứng quần thể có thể bị ức chế từ cả hai mẫu MBM.

Ví dụ 6

Xử lý sơ bộ nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật để amoni hoá bằng *Aspergillus Oryzae*

Việc amoni hoá nguyên liệu giàu hydrat cacbon từ thực vật bởi các quần thể vi khuẩn hỗn hợp có thể gây axit hoá hỗn hợp nuôi cấy như được mô tả trong Ví dụ 2 và Ví dụ 3. Trong thử nghiệm này, nguyên liệu từ thực vật được xử lý sơ bộ bằng *Aspergillus oryzae* để làm giảm hiệu ứng axit hoá của nguyên liệu từ thực vật đối với quá trình amoni hoá.

Trước tiên, bã cải dầu, sinh khối lúa mì, sinh khối lúa mạch, dịch ngâm lúa mạch, và chất thải thực phẩm (chủ yếu chứa nguyên liệu từ thực vật, nhưng cũng chứa một lượng thịt nhất định) được thuỷ phân bằng *Aspergillus oryzae* CECT 2095. Điều chế môi trường chứa 36g bã cải dầu hoặc sinh khối lúa mì và 90ml nước máy trong bình Erlenmeyer có dung tích 1 lít. Điều chế môi trường chứa 18g sinh khối lúa mạch và 45ml nước máy, 18g dịch ngâm lúa mạch và

20ml nước máy, hoặc 32g chất thải thực phẩm và 43ml nước máy trong bình Erlenmeyer có dung tích 500ml. Môi trường chứa bã cải dầu và sinh khối lúa mì được hấp trong nồi hấp ở nhiệt độ $+121^{\circ}\text{C}$ để khử trùng môi trường này hoặc để ở dạng không vô trùng. Môi trường chứa lúa mạch và môi trường chứa chất thải thực phẩm được để ở dạng không vô trùng.

Trước tiên, *A. oryzae* CECT 2095 được nuôi cấy trên đĩa aga chứa dextroza khoai tây (đun sôi 300g đã được thái trong 500ml nước cho đến khi chín kỹ, lọc chất lỏng và thêm nước vào đến 1000ml; thêm 20g glucoza và 15g aga vào; môi trường này được hấp trong nồi hấp ở nhiệt độ $+121^{\circ}\text{C}$ và rót lên các đĩa aga) trong thời gian 3-7 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó, cấy *A. oryzae* trong môi trường lỏng chứa dextroza khoai tây (được điều chế theo phương pháp giống như phương pháp điều chế aga chứa dextroza khoai tây nhưng không bổ sung aga) và nuôi cấy nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc nhẹ trong thời gian 3-5 ngày. Lần lượt cấy 10ml và 5ml hỗn hợp nuôi cấy dạng lỏng này trong môi trường chứa trong bình Erlenmeyer có dung tích 1 lít và 500ml. Nồng độ cuối trong môi trường là như sau: bã cải dầu, sinh khối lúa mì, và sinh khối lúa mạch 360 g/lít, dịch ngâm lúa mạch 720 g/lít, và chất thải thực phẩm 400 g/lít.

Ủ tất cả các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ $+30^{\circ}\text{C}$ trong 14 ngày. Tiếp đó, cân hỗn hợp nuôi cấy và thêm nước vào hỗn hợp nuôi cấy tương ứng với lượng nước bay hơi từ hỗn hợp nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy. Amoni hoá môi trường đã được thuỷ phân bằng *A. oryzae* bằng cách sử dụng quần thể vi khuẩn hỗn hợp S1. Đầu tiên, thêm nước máy vào các hỗn hợp nuôi cấy để thu được nồng độ 90g nguyên liệu từ thực vật trong mỗi lít nước. Môi trường chứa chất thải thực phẩm được giữ ở nồng độ 40% ban đầu. Thêm nguyên liệu cấy S1 5% (thể tích/thể tích) vào 40 hoặc 60ml môi trường, và ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ $+50^{\circ}\text{C}$ trong 7 ngày, và mức độ tạo amoni trong các hỗn hợp nuôi cấy

được xác định bằng cách sử dụng kit xác định amoniac bằng enzym (Amoniac Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich).

Để làm mẫu đối chứng, bã cải dầu, sinh khối lúa mì, sinh khối lúa mạch, dịch ngâm lúa mạch, và chất thải thực phẩm được amoni hoá bởi quần thể S1 mà không hề được xử lý sơ bộ. Môi trường chứa sinh khối lúa mì, bã cải dầu, sinh khối lúa mạch, hoặc dịch ngâm lúa mạch với lượng 180 g/lít trong mỗi lít nước và hỗn dịch chứa chất thải thực phẩm với hàm lượng 40% được điều chế trong nước máy. Thêm nguyên liệu cây chứa quần thể S1 với hàm lượng 5% trong 40 hoặc 60ml môi trường vào, và ủ các hỗn hợp nuôi cấy ở nhiệt độ +50°C trong 7 ngày. Độ pH của hỗn hợp nuôi cấy không được điều chỉnh hoặc sau đó độ pH được điều chỉnh hằng ngày (vào ngày 0, 1, 2, 3, và 4) đến mức trung tính bằng cách sử dụng NaOH. Mức độ tạo amoni của hỗn hợp nuôi cấy được xác định bằng cách sử dụng kit xác định amoniac bằng enzym (Amoniac Assay Kit AA0100; Sigma-Aldrich).

Kết quả. Sau 14 ngày xử lý sơ bộ bằng *A. oryzae*, độ pH của hỗn hợp nuôi cấy nằm trong khoảng từ 7 đến 9. Trong tất cả các môi trường chứa nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật không được xử lý sơ bộ, độ pH của môi trường là độ pH axit. Việc xử lý sơ bộ nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật bằng *A. oryzae* có tác dụng tăng hiệu suất tạo amoniac ở mức 1,7-8 lần khi so sánh với nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật không được xử lý sơ bộ (Bảng 11). Thu được mức độ tạo amoni gia tăng tương đương khi điều chỉnh độ pH của hỗn hợp nuôi cấy hằng ngày bằng NaOH. Theo đó, việc xử lý sơ bộ nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật bằng *A. oryzae* là một biện pháp khác để khắc phục hiệu ứng axit hoá nguyên liệu giàu hydrat cacbon có nguồn gốc từ thực vật trong quá trình amoni hoá. Nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật có thể được khử trùng trước khi xử lý sơ bộ bằng *A. oryzae*, hoặc được để ở dạng không vô trùng.

Bảng 11. Mức độ tạo amoni của quần thể S1 đối với các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật khác nhau được hoặc không được điều chỉnh độ pH hằng ngày (môi trường không vô trùng được sử dụng) hoặc được xử lý sơ bộ trong thời gian 14 ngày bằng *A. oryzae* (môi trường được để ở dạng không vô trùng hoặc được khử trùng trước khi cấy *A. oryzae*). Mức độ tạo amoni được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm N được chuyển hoá thành nitơ trong thời gian 7 ngày. Các kết quả là giá trị trung bình của hai thử nghiệm trên mẫu lặp sinh học và ba lần đo lặp lại của mỗi mẫu. Trong thử nghiệm với *A. oryzae*, hai mẫu nuôi cấy *A. oryzae* lặp sinh học và hai mẫu nuôi cấy S1 lặp sinh học được thử nghiệm.

	Không điều chỉnh độ pH	Điều chỉnh độ pH	Xử lý trước bằng <i>A. oryzae</i> (không vô trùng)	Xử lý trước bằng <i>A. oryzae</i> (vô trùng)
Sinh khối lúa mạch	$28,2 \pm 3,1\%$	$68,3 \pm 10,1\%$	$47,5 \pm 9,8\%$	
Dịch ngâm lúa mạch	$14,5 \pm 1,6\%$	$72,9 \pm 8,4\%$	$73,1 \pm 11,4\%$	
Bã cải dầu	$7,2 \pm 1,5\%$	$42,4 \pm 10,1\%$	$58,2 \pm 4,4\%$	$52,8 \pm 7,1\%$
Lúa mì	$5,5 \pm 0,6\%$	$55,0 \pm 6,6\%$	$21,7 \pm 4,2\%$	$32,4 \pm 2,8\%$
Thực phẩm	$8,6 \pm 0,7\%$	$44,9 \pm 9,7\%$	$67,4 \pm 8,0\%$	

Ví dụ 7

Các quần thể tự nhiên và quần thể có nguồn gốc từ bột thịt và xương để dùng làm quần xã amoni hoá

Việc phân tích quần xã vi khuẩn của các quần thể tự nhiên trong sản phẩm phụ của gà giò (CBP-M), sản phẩm phụ của lợn/bò (PB-M), lông vũ gà (FE-M), sản phẩm phụ của cá (MF-M) và xương lợn/bò nghiền (CB-M) được thực hiện trên ADN thu được bằng cách chiết bằng phenol-cloroform-ruợu isoamyllic từ hỗn hợp nuôi cấy, trong đó các tế bào được phá vỡ bằng cách gậy va đập với hạt. Cho các quần thể nuôi cấy phát triển và thu hồi từ nguyên liệu có với hàm lượng 20% (trọng lượng/thể tích) được ủ ở nhiệt độ 50°C trong bốn ngày (FE trong 8 ngày). Thử nghiệm trên gen 16S của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự dựa trên việc phát hiện mức giải phóng pyrophosphat

(pyrosequencing) bằng cách sử dụng amplicon FLX được mã hoá bằng đoạn cài (tag) (bTEFAP) và việc phân tích số liệu về tính đa dạng vi khuẩn được thực hiện bởi Research and Testing Lab (Lubbock, Texas, Hoa Kỳ) theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu: Dowd *et al.* 2008a và Wolcott *et al.* 2009. Các đoạn mồi 28F ‘GAGTTTGATCNTGGCTCAG’ (SEQ ID NO: 1) và 519R ‘GTNTTACNGCGGCKGCTG’ (SEQ ID NO: 2) được sử dụng để khuếch đại các vùng biến đổi 16S V1-3.

Kết quả. Việc phân tích tính đa dạng vi khuẩn của các quần xã tự nhiên và các quần xã được cấy cho thấy sự có mặt của các vi khuẩn thuộc 58 giống khác nhau (Bảng 12). Trong tổng số 115 kết quả, có 79 kết quả được nhận biết ở mức loài và 36 kết quả được nhận biết ở mức giống. Bảng 13 thể hiện các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong mỗi quần thể. Các vi khuẩn thuộc 5–9 giống khác nhau tạo thành phần lớn của các quần thể này. *Clostridium* spp. và *Sporanaerobacter acetigenes* chiếm ưu thế trong các quần thể có nguồn gốc từ nguyên liệu S1 được cấy cũng như các quần thể tự nhiên của PB-M và MF-M. Ba quần thể tự nhiên khác thể hiện tính đa dạng cao hơn: CBP-M chủ yếu bao gồm *Enterococcus* spp. và *Pediococcus* spp., quần thể FE-M bao gồm *Petrobacter succinatimandens*, *Soehngenia saccharolytica*, *Tissierella* sp., và *Clostridium* spp., và quần thể CB-M bao gồm *Leptothrix* sp. và *Schlegelella* spp.

Hệ số tương quan (Bảng 14) được tính từ số liệu được thể hiện trong Bảng 12 bằng cách sử dụng phương trình [1], trong đó X và Y được dùng để chỉ hai ma trận, ví dụ CBP-M và CBP, mà giữa chúng được tính tương quan, x và y là các giá trị đơn bên trong một ma trận, và $\bar{x}$ và $\bar{y}$ là giá trị trung bình của tất cả các giá trị bên trong một ma trận. Loài không có mặt trong quần thể (các tế bào trống trong Bảng 12) được gán giá trị 0.

$$\text{Tương quan } (X, Y) = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad [1]$$

Bảng 14 cho thấy tính tương tự cao giữa các quần thể trong tất cả năm nguyên liệu đã cấy và các quần thể tự nhiên PB-M và MF-M. Các quần thể tự nhiên CBP-M, FE-M, và CB-M còn lại cho thấy mức độ tương tự nhau thấp cũng như mức độ tương tự thấp với các quần thể khác. Như đã trình bày trên đây dựa trên các kết quả nêu trong Bảng 3, S1 có tính cạnh tranh cao hơn các quần thể tự nhiên có mặt trong các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật. Tuy nhiên, một quần thể tương tự với S1 có thể phát triển trong các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật (PB-M và MF-M) trong các điều kiện được sử dụng. Điều này có thể là do bột thịt và xương, nguồn chứa S1 và các quần thể amoni hoá hữu hiệu khác A1, C1, H1, và P1 (xem Ví dụ 5), được sản xuất từ sản phẩm phụ thu được khi giết mổ các loài động vật khác nhau. Tuy nhiên, việc so sánh các quần thể tự nhiên và các quần thể được cấy của CBP, FE, và CB cho thấy quần xã vi khuẩn có thể phát triển với các tỷ lệ khác nhau trong các điều kiện tương tự. Bảng 14 cũng thể hiện hiệu suất tạo amoni, tức là tỷ lệ phần trăm nitơ trong nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật được chuyển hoá thành amoniac tại thời điểm thu hồi quần thể này để chiết ADN. Hiệu suất này tương quan với mức độ tương tự của quần thể tự nhiên với quần thể được cấy. Chỉ đạt được hiệu suất 40% hoặc lớn hơn khi hệ số tương quan lớn hơn 0,9, và tốt hơn nếu lớn hơn 0,95.

Bảng 12. Kết quả phân tích tính đa dạng vi khuẩn: giống và loài trong các quần thể tự nhiên với các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật: sản phẩm phụ của gà giò của gà (CBP-M), sản phẩm phụ của lợn/bò (PB-M), gà lông vũ (FE-M), sản phẩm phụ của cá (MF-M) và xương lợn/bò nghiền (CB-M). Việc phân tích tính đa dạng cũng được thực hiện đối với các nguyên liệu tương tự được cấy quần thể S1 có nguồn gốc từ bột thịt và xương với hàm lượng 5% (thể tích/thể tích). Các kết quả này được ký hiệu là CBP, PB, FE, MF hoặc CB, và giống như được thể hiện trong Bảng 1. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	CBP-M	CBP	PB-M	PB	FE-M	FE	MF-M	MF	CB-M	CB
<i>Acidovorax temperans</i>					0,06					
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>			0,08							
<i>Bacillus coagulans</i>	0,64									
<i>Bacillus licheniformis</i>									1,55	
<i>Bacillus</i> sp.	1,56	0,10		0,13	0,11	0,03	0,01		0,08	2,20
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>			0,06	0,05		0,02	0,16			0,28
<i>Brevibacillus agri</i>					0,22					
<i>Burkholderia endofungorum</i>									0,01	
<i>Burkholderia</i> sp.									0,01	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>			0,02							
<i>Caldicoprobacter oshimai</i>								0,02		0,03
<i>Caloramator</i> sp.		0,13		3,18	0,56	1,37		1,62	0,06	3,38
<i>Carnobacterium divergens</i>	0,20	0,02	0,03							0,01
<i>Carnobacterium</i> sp.	0,09		0,03							
<i>Catabacter</i> sp.				0,02						0,03
<i>Cerasibacillus quisquiliarum</i>			0,05							
<i>Clostridium botulinum</i>		1,13		6,23	0,20	0,25		1,17	0,01	1,43
<i>Clostridium cochlearium</i>	0,02	2,89	15,03	2,16		0,96	30,47	2,93	0,01	5,98
<i>Clostridium gasigenes</i>										0,01
<i>Clostridium haemolyticum</i>		0,06								
<i>Clostridium methylpentosum</i>	0,03									
<i>Clostridium nexile</i>	0,02									
<i>Clostridium novyi</i>		0,08								

<i>Clostridium oceanicum</i>				0,03						
<i>Clostridium pasteurianum</i>			0,02							
<i>Clostridium perfringens</i>			0,01	0,14						
<i>Clostridium</i> sp.	0,61	0,42		0,67	0,11	0,28		0,17	0,01	0,51
<i>Clostridium sporogenes</i>		3,03	3,18	4,12	3,75	0,03	2,84	0,22		1,67
<i>Clostridium subterminale</i>					0,03					
<i>Clostridium tetani</i>			0,01							
<i>Clostridium ultunense</i>		0,23		0,22	6,64	2,20	0,01	1,92	0,03	0,89
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>										0,01
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>						0,02				0,01
<i>Cyanobacterium</i> sp						0,02				
<i>Enterococcus avium</i>	0,05									
<i>Enterococcus azikeevi</i>	0,33									
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,02									
<i>Enterococcus cecorum</i>			0,01							
<i>Enterococcus devriesei</i>	0,11									
<i>Enterococcus durans</i>	0,02									
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,08					0,08				
<i>Enterococcus faecium</i>	15,49		0,01						0,24	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	0,05									
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	0,03									
<i>Enterococcus hirae</i>	0,78									
<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,05									
<i>Enterococcus</i> sp.	0,26		0,05			0,06				
<i>Eubacterium</i> sp.	0,11									
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,09									

<i>Faecalibacterium</i> sp.				0,05						
<i>Garciella</i> sp.				0,06				0,02		0,06
<i>Gemella haemolysans</i>			0,01							
<i>Geobacter grbiciae</i>				0,01						
<i>Granulicatella elegans</i>	0,06				0,03					
<i>Granulicatella</i> sp.	0,02									
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,22									
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0,09					0,05				
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	0,06									
<i>Lactobacillus pontis</i>	0,02									
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,14									
<i>Lactobacillus sakei</i>	0,17									
<i>Lactobacillus</i> sp	0,14									
<i>Lactococcus garvieae</i>	1,39									
<i>Lactococcus lactis</i>	0,17									
<i>Lactococcus piscium</i>			0,01						0,02	
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,23									
<i>Lactococcus</i> sp	2,63		0,06							
<i>Lautropia</i> sp.									0,01	
<i>Leptothrix</i> sp.									35,27	
<i>Macrooccus caseolyticus</i>						1,93				
<i>Mahella australiensis</i>				0,27	0,34	0,17		0,12	0,05	0,40
<i>Mycobacterium phocaicum</i>						0,02				
<i>Natronincola ferrireducens</i>			0,02							
<i>Niastella</i> sp.	0,03									
<i>Octadecabacter</i> sp.							0,01			
<i>Pediococcus acidilactici</i>	67,58		0,01							

<i>Pediococcus</i> sp.	0,09									
<i>Peptostreptococcus</i> sp			1,81							
<i>Petrobacter succinatimandens</i>	0,05				37,89					
<i>Propionibacterium acnes</i>		0,02		0,01						
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>										0,01
<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>					0,67					
<i>Rhodobacter</i> sp.				0,02						
<i>Ruminococcus albus</i>	0,03									
<i>Ruminococcus</i> sp.						0,02				
<i>Salicola marasensis</i>									0,01	
<i>Sarcina</i> sp.						0,02				
<i>Schlegelella</i> sp.									0,72	
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>									60,58	
<i>Soehngenia saccharolytica</i>					30,69					
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	0,02	90,62	78,83	81,17	0,03	92,24	64,14	90,80	1,33	81,08
<i>Sporomusa aerivorans</i>					0,03					
<i>Sporomusa</i> sp.					0,06					
<i>Sporotalea propionica</i>					0,20					
<i>Sporotalea</i> sp.					0,03					
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	0,08									
<i>Streptococcus parauberis</i>	0,05									
<i>Streptococcus</i> sp.	0,12									
<i>Subdoligranulum</i> sp.	0,06			0,01						
<i>Subdoligranulum variabile</i>	0,12									

<i>Tateyamaria</i> sp.							0,01			
<i>Tepidanaerobacter</i> sp.		0,84	0,60	0,44			2,33	0,43		0,25
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	0,02									
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	0,93									
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	0,02									
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	0,76									
<i>Thermosediminibacter</i> sp.				0,01						
<i>Tissierella creatinophila</i>		0,02								
<i>Tissierella praeacuta</i>								0,02		0,03
<i>Tissierella</i> sp.		0,40	0,08	1,00	18,09	0,22	0,01	0,56	0,03	1,70
<i>Trichococcus</i> sp.	0,02									
<i>Vagococcus</i> sp.	0,05									
<i>Verrucomicrobium</i> sp.						0,02				
<i>Weissella</i> sp.	0,02									
<i>Xanthomonas campestris</i>					0,28					

Bảng 13. Các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong các quần thể CBP-M, CBP, PB-M, PB, FE-M, FE, MF-M, MF, CB-M, và CB. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	CBP-M	CBP	PB-M	PB	FE-M	FE	MF-M	MF	CB-M	CB
<i>Bacillus</i> spp.	2,20	0,10	0,06	0,18	0,11	0,05	0,17		1,63	2,49
<i>Caloramator</i> spp.		0,13		3,18	0,56	1,37		1,62	0,06	3,38
<i>Clostridium</i> spp.	0,67	7,85	18,25	13,58	10,73	3,73	33,33	6,41	0,06	10,49
<i>Enterococcus</i> spp.	21,25		0,07			0,14			0,24	
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,84					0,05				
<i>Lactococcus</i> spp.	4,43		0,07						0,02	
<i>Leptothrix</i> sp.									35,27	
<i>Macroccus</i>						1,93				

<i>caseolyticus</i>										
<i>Pediococcus</i> spp.	67,67		0,01							
<i>Peptostreptococcus</i> sp.			1,81							
<i>Petrobacter succinatimandens</i>	0,05				37,89					
<i>Schlegelella</i> spp.									61,29	
<i>Soehngenia saccharolytica</i>					30,69					
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	0,02	90,62	78,83	81,17	0,03	92,24	64,14	90,80	1,33	81,08
<i>Tepidanaerobacter</i> sp.		0,84	0,60	0,44			2,33	0,43		0,25
<i>Thermoanaerobacterium</i> spp.	1,73									
<i>Tissierella</i> spp.		0,42	0,08	1,00	18,09	0,22	0,01	0,58	0,03	1,73
Khác	1,15	0,04	0,23	0,46	1,90	0,27	0,02	0,16	0,08	0,58
Tổng	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Bảng 14. Hệ số tương quan giữa các tính đa dạng vi khuẩn của các quần thể hỗn hợp được tính từ số liệu thể hiện trong Bảng 12 bằng cách sử dụng phương trình [1]. Hiệu suất (hàng cuối) là tỷ lệ phần trăm nitơ trong nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật được chuyển hoá thành amoniac tại thời điểm thu hồi quần thể này để chiết ADN.

	CBP-M	CBP	PB-M	PB	FE-M	FE	MF-M	MF	CB-M	CB
CBP_M	1	-0,0137	-0,0154	-0,0152	-0,0238	-0,0134	-0,0176	-0,0137	-0,0173	-0,0147
CBP	-0,0137	1	0,9874	0,9971	-0,0137	0,9986	0,9155	0,9992	0,0053	0,9977
PB_M	-0,0154	0,9874	1	0,9827	-0,0173	0,9824	0,9667	0,9863	0,0032	0,9912
PB	-0,0152	0,9971	0,9827	1	-0,0111	0,9951	0,9094	0,9964	0,0038	0,9963
FE_M	-0,0238	-0,0137	-0,0173	-0,0111	1	-0,0136	-0,0204	-0,0127	-0,0239	-0,0094
FE	-0,0134	0,9986	0,9824	0,9951	-0,0136	1	0,9050	0,9995	0,0056	0,9965
MF_M	-0,0176	0,9155	0,9667	0,9094	-0,0204	0,9050	1	0,9144	-0,0003	0,9293
MF	-0,0137	0,9992	0,9863	0,9964	-0,0127	0,9995	0,9144	1	0,0054	0,9982
CB_M	-0,0173	0,0053	0,0032	0,0038	-0,0239	0,0056	-0,0003	0,0054	1	0,0038
CB	-0,0147	0,9977	0,9912	0,9963	-0,0094	0,9965	0,9293	0,9982	0,0038	1
Hiệu suất (%)	7,4	89,4	54,9	94,9	25,0	50,1	63,3	91,3	6,5	71,4

Ví dụ 8

Hiệu suất amoni hoá bởi các quần thể có nguồn gốc từ đất và bột thịt và xương

Để so sánh thành phần quần xã vi khuẩn và hiệu suất amoni hoá của các quần thể có nguồn gốc từ bột thịt và xương và các nguồn khác, các quần thể tự nhiên được nuôi cấy đất rừng và đất ruộng.

Các quần thể FO1 và FI1 được tạo ra bằng cách trộn đất rừng (FO) hoặc đất ruộng (FI) không vô trùng với nước máy lạnh với tỷ lệ 180g đất trong mỗi lít nước. Hỗn hợp thu được được nuôi cấy mà không thông khí ở nhiệt độ 50°C. Các quần thể FO2 và FI2 được tạo ra bằng cách trộn đất rừng (FO) hoặc đất ruộng (FI) không vô trùng với nước máy đang sôi với tỷ lệ 180g đất trong mỗi lít nước. Hỗn hợp thu được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Tất cả các hỗn hợp được ủ mà không thông khí ở nhiệt độ 50°C. Sau khi ủ trong thời gian 7 ngày, cấy 5ml từng hỗn hợp nuôi cấy trong 100ml môi trường MBM1 vô trùng chứa 180g MBM1 trong mỗi lít nước. Ủ các hỗn hợp nuôi cấy này ở nhiệt độ 50°C trong 7 ngày.

Việc phân tích quần xã vi khuẩn của các quần thể trong đất được thực hiện trên ADN thu được bằng cách chiết bằng phenol-cloroform-rượu isoamyllic từ hỗn hợp nuôi cấy, trong đó các tế bào được phá vỡ bằng cách gậy và đập với hạt. Thử nghiệm trên gen 16S của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự dựa trên việc phát hiện mức giải phóng pyrophosphat (pyrosequencing) bằng cách sử dụng amplicon FLX được mã hoá bằng đoạn cài (tag) (bTEFAP) và việc phân tích số liệu về tính đa dạng vi khuẩn được thực hiện bởi Research and Testing Lab (Lubbock, Texas, Hoa Kỳ) theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu: Dowd *et al.* 2008a và Wolcott *et al.* 2009. Các đoạn mồi 28F ‘GAGTTTGATCNTGGCTCAG’ (SEQ ID NO: 1) và 519R ‘GTNTTACNGCGGCKGCTG’ (SEQ ID NO: 2) được sử dụng để khuếch đại các vùng biến đổi 16S V1-3.

Kết quả. Việc phân tích tính đa dạng vi khuẩn của các quần thể có nguồn gốc từ đất và MBM cho thấy sự có mặt của các vi khuẩn thuộc 45 giống khác nhau (Bảng 15). Trong tổng số 85 kết quả, có 66 kết quả được nhận biết ở mức loài và 19 kết quả được nhận biết ở mức giống. Bảng 16 thể hiện các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong mỗi quần thể. Các vi khuẩn thuộc 6-7 giống khác nhau tạo thành phần lớn của các quần thể. *Clostridium* spp. và *Sporanaerobacter acetigenes* chiếm ưu thế trong các quần thể có nguồn gốc từ MBM cũng như FO1 và FI1. Hai quần thể khác có nguồn gốc từ đất thể hiện tính đa dạng cao hơn: FO2 chủ yếu bao gồm *Bacillus* spp., *Thermoanaerobacterium* spp., và *Clostridium* spp., và FI2 bao gồm *Clostridium* spp., *Tissierella* sp., và *Caloramator* sp.

Hệ số tương quan (Bảng 17) được tính từ số liệu được thể hiện trong Bảng 15 bằng cách sử dụng phương trình [1], trong đó X và Y được dùng để chỉ hai ma trận, ví dụ A1 và C1, mà giữa chúng được tính tương quan, x và y là các giá trị đơn bên trong một ma trận, và $\bar{x}$ và $\bar{y}$ là giá trị trung bình của tất cả các giá trị bên trong một ma trận. Loài không có mặt trong quần thể (các tế bào trống trong Bảng 15) được gán giá trị 0.

$$\text{Tương quan } (X, Y) = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad [1]$$

Bảng 17 thể hiện mức độ tương tự cao (hệ số tương quan $> 0,9$) giữa tất cả năm quần thể có nguồn gốc từ MBM, cũng như các quần thể có nguồn gốc từ đất FO1 và FI1. Theo đó, các quần thể tương tự với các quần thể có nguồn gốc từ MBM có thể phát triển từ đất. Hệ số tương quan của FO2 và FI2 là nhỏ hơn 0,2, qua đó cho thấy mức độ tương tự thấp. Do đó, việc hoà tan đất trong nước đang sôi sẽ khiến các vi khuẩn quan trọng để amoni hoá bị tiêu diệt. Bảng 17 cũng thể hiện hiệu suất tạo amoni, tức là tỷ lệ phần trăm nitơ trong MBM được chuyển hoá thành amoniac tại thời điểm thu hồi quần thể này để chiết ADN. Hiệu suất này tương quan với mức độ tương tự của quần thể tự nhiên với

quần thể được cấy. Chỉ đạt được hiệu suất 40% hoặc lớn hơn khi hệ số tương quan lớn hơn 0,9.

Bảng 15. Kết quả phân tích tính đa dạng của quần xã vi khuẩn: giống và loài trong các quần thể có nguồn gốc từ đất và bột thịt và xương A1, C1, H1, P1, và S1. Kết quả của các quần thể có nguồn gốc từ bột thịt và xương A1, C1, H1, P1, và S1 là giống như được thể hiện trong Bảng 1. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	A1	C1	H1	P1	S1	FO1	FO2	FI1	FI2
<i>Alicyclobacillus contaminans</i>							0,23		
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>									0,12
<i>Bacillus beijingensis</i>						0,04	0,02		
<i>Bacillus benzoovorans</i>							0,02		
<i>Bacillus coagulans</i>						0,34	8,71		
<i>Bacillus ginsengi</i>							0,02		
<i>Bacillus nealsonii</i>							0,06		
<i>Bacillus pichinotyi</i>							0,02		
<i>Bacillus smithii</i>							0,02		
<i>Bacillus</i> sp.	0,77	0,53	1,46	0,97	0,40	1,22	29,82		0,18
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	0,22	0,11	0,51	0,39	0,09				
<i>Bacillus vireti</i>							0,04		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		0,02							0,02
<i>Caldicoprobacter oshimai</i>	0,05	0,04	0,11	0,02	0,09				0,02
<i>Caloramator fervidus</i>				0,02					
<i>Caloramator</i> sp.	5,04	2,67	4,29	4,04	5,20	3,61		0,75	7,66
<i>Carnobacterium divergens</i>							0,06		
<i>Catabacter</i> sp.				0,02					
<i>Clostridium beijerinckii</i>							0,04		
<i>Clostridium botulinum</i>		6,95		6,61	4,63	2,88			
<i>Clostridium cochlearium</i>	5,79	6,44	6,92	11,84	8,50	6,59	0,06	1,80	16,38
<i>Clostridium haemolyticum</i>		0,06							
<i>Clostridium hveragerdense</i>									0,02
<i>Clostridium limosum</i>									0,02
<i>Clostridium oceanicum</i>		0,06		0,02	0,06	0,08			
<i>Clostridium pasteurianum</i>							0,45		
<i>Clostridium purinilyticum</i>								0,03	
<i>Clostridium</i> sp.	0,22	0,49	0,62	0,12	0,57	1,11	16,16	6,34	9,27
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,55	0,53	1,18	0,19	0,48	1,24	0,06	3,68	22,37

<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>									0,02
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>							0,06		
<i>Clostridium ultunense</i>	2,58	5,51	0,84	15,17	1,25	0,01		2,82	4,01
<i>Clostridium xylanovorans</i>							0,08		
<i>Empedobacter brevis</i>							0,02		
<i>Enterobacter cloacae</i>							0,02		
<i>Enterococcus azikeevi</i>							0,04		
<i>Enterococcus faecalis</i>							0,30		
<i>Enterococcus faecium</i>							1,06		
<i>Enterococcus hirae</i>							0,04	0,05	
<i>Enterococcus raffinosus</i>							0,02		
<i>Enterococcus sp.</i>							0,02		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>							0,02		0,02
<i>Faecalibacterium sp.</i>			0,02			0,04		0,03	0,04
<i>Fervidicola ferrireducens</i>				0,02					
<i>Garciella sp.</i>	0,07	0,08	0,04	0,08	0,03	0,01			0,04
<i>Halobacillus trueperi</i>							0,04		
<i>Klebsiella oxytoca</i>							0,04		
<i>Lactobacillus crispatus</i>				0,04					
<i>Lactobacillus pontis</i>							0,02		
<i>Lactococcus garvieae</i>							0,13		
<i>Lactococcus raffinolactis</i>							0,06		
<i>Lactococcus sp.</i>							0,13		
<i>Leptospira broomii</i>		0,02							
<i>Mahella australiensis</i>	0,55	0,36	0,34	0,35	0,43	1,34		0,35	4,59
<i>Microbacterium aurum</i>		0,02							
<i>Pantoea sp.</i>							0,02		
<i>Pediococcus acidilactici</i>							4,80		
<i>Pelosinus sp.</i>									0,02
<i>Peptostreptococcus sp.</i>						0,01		0,19	0,27
<i>Petrobacter succinatimandens</i>							0,04		
<i>Propionibacterium sp.</i>					0,03				
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>					0,03				
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>							0,13		
<i>Shigella flexneri</i>							0,02		
<i>Soehngenella sp.</i>								0,03	
<i>Sphingomonas mucosissima</i>		0,02							
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	77,44	74,26	80,66	53,67	75,87	80,50	0,04	77,63	
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>							0,08		
<i>Sporotalea sp.</i>									0,02
<i>Streptococcus alactolyticus</i>							0,02		

<i>Streptococcus mitis</i>								0,03	
<i>Subdoligranulum variabile</i>							0,06		
<i>Symbiobacterium</i> sp.						0,12			
<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	2,26	1,42	1,22	4,17	0,68	0,12		1,29	4,48
<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>									0,51
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>						0,50	0,89		
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>							19,97		
<i>Thermoanaerobacterium islandicum</i>						0,01			
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.						0,04	0,28		
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>						0,10	15,65		
<i>Thermosediminibacter</i> sp.						0,07			
<i>Tissierella creatinophila</i>		0,02							
<i>Tissierella praeacuta</i>				0,02					
<i>Tissierella</i> sp.	4,45	0,38	1,78	2,22	1,68		0,02	4,97	29,93
<i>Tuberibacillus calidus</i>							0,02		

Bảng 16. Các giống và loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong các quần thể có nguồn gốc từ MBM và đất. Các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với quần thể toàn phần.

Loài	A1	C1	H1	P1	S1	FO1	FO2	FI1	FI2
<i>Bacillus</i> spp.	0,99	0,64	1,97	1,37	0,48	1,60	38,74		0,18
<i>Caloramator</i> spp.	5,04	2,67	4,29	4,06	5,20	3,61		0,75	7,66
<i>Clostridium</i> spp.	9,15	20,04	9,56	33,96	15,49	11,91	16,93	14,68	52,08
<i>Enterococcus</i> spp.							1,49	0,05	
<i>Mahella australiensis</i>	0,55	0,36	0,34	0,35	0,43	1,34		0,35	4,59
<i>Pediococcus</i> spp.							4,80		
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	77,44	74,26	80,66	53,67	75,87	80,50	0,04	77,63	
<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	2,26	1,42	1,22	4,17	0,68	0,12		1,29	4,48
<i>Thermoanaerobacterium</i> spp.						0,65	36,79		
<i>Tissierella</i> spp.	4,45	0,40	1,78	2,24	1,68		0,02	4,97	29,93
Khác	0,12	0,21	0,17	0,19	0,17	0,26	1,19	0,27	1,08
Tổng	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Bảng 17. Hệ số tương quan giữa các tính đa dạng vi khuẩn của các quần thể hỗn hợp được tính từ số liệu thể hiện trong Bảng 15 bằng cách sử dụng phương trình [1]. Hiệu suất (hàng cuối) là tỷ lệ phần trăm nitơ trong nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật được chuyển hoá thành amoniac tại thời điểm thu hồi quần thể này để chiết ADN.

	A1	C1	H1	P1	S1	FO1	FO2	FI1	FI2
A1	1	0,9929	0,9988	0,9554	0,9964	0,9963	-0,0268	0,9930	0,0577
C1	0,9929	1	0,9933	0,9704	0,9968	0,9952	-0,0288	0,9872	0,0213
H1	0,9988	0,9933	1	0,9505	0,9975	0,9988	-0,0177	0,9924	0,0371
P1	0,9554	0,9704	0,9505	1	0,9597	0,9490	-0,0349	0,9409	0,1097
S1	0,9964	0,9968	0,9975	0,9597	1	0,9984	-0,0290	0,9877	0,0434
FO1	0,9963	0,9952	0,9988	0,9490	0,9984	1	-0,0161	0,9911	0,0187
FO2	-0,0268	-0,0288	-0,0177	-0,0349	-0,0290	-0,0161	1	-0,0035	0,0230
FI1	0,9930	0,9872	0,9924	0,9409	0,9877	0,9911	-0,0035	1	0,0699
FI2	0,0577	0,0213	0,0371	0,1097	0,0434	0,0187	0,0230	0,0699	1
Hiệu suất (%)	55,0	43,1	61,5	47,6	58,5	46,5	0,4	44,6	27,0

Ví dụ 9

Hiệu suất amoni hoá bởi các quần thể có nguồn gốc từ dạ cỏ bò và bột thịt và xương

Để so sánh hiệu suất amoni hoá các quần thể có nguồn gốc từ bột thịt và xương với các nguồn khác, quần thể có nguồn gốc từ dạ cỏ bò được nghiên cứu. Việc tạo amoniac quá mức là một yếu tố chính gây ra tình trạng thiếu hiệu quả dinh dưỡng ở động vật nhai lại. Phần lớn của hoạt tính dị hoá axit amin và theo đó là hoạt tính tạo amoniac của dạ cỏ được quy cho một số vi sinh vật nhất định được gọi là các vi khuẩn tạo có khả năng tạo amoniac cao (hyper amoniac-producing bacteria – HAB) (Russell *et al.* 1988; Chen and Russell

1989; Krause and Russell 1996, Eschenlauer *et al.* 2002). Do đó, dạ cỏ có thể là nguồn vi khuẩn amoni hoá hữu hiệu.

Việc làm giàu quần thể amoni hoá được thử nghiệm bằng nhiều chu trình nuôi cấy liên tiếp các vi khuẩn từ dạ cỏ bò trong MBM1 vô trùng. Phần bên trong dạ cỏ bò được lấy từ bò được đặt ống thông, và được lọc để tách chất lỏng ra khỏi các chất rắn. Thêm chất lỏng thu được vào môi trường MBM1 vô trùng [180g bột thịt và xương 1 trong mỗi lít nước] dưới dạng nguyên liệu cấy với hàm lượng 25% (thể tích/thể tích), và được nuôi cấy mà không thông khí ở nhiệt độ 37°C. Mỗi chu trình làm giàu kéo dài trong thời gian 7 ngày để cho phép phản ứng amoni hoá đạt tới mức đủ.

Kết quả. Hiệu suất tạo amoniac, tức là tỷ lệ phần trăm nitơ được chuyển hoá thành amoniac gia tăng từ $12,3\% \pm 6,6\%$ đến $24,7\% \pm 3,1\%$ trong ba chu trình làm giàu đầu tiên, nhưng giữ nguyên ở mức này trong bốn chu trình tiếp theo. Như được thể hiện trên FIG.1 trong Ví dụ 1, các quần thể có nguồn gốc từ MBM tạo ra hiệu suất tạo amoniac cao hơn nằm trong khoảng từ $37,9\% \pm 2,3\%$ đến $58,8\% \pm 13,9\%$ ở nhiệt độ 37°C. Do đó, mặc dù đã được làm giàu, song quần thể có nguồn gốc từ dạ cỏ vẫn có hiệu suất amoni hoá thấp hơn so với các quần thể có nguồn gốc từ MBM.

Các quần thể có nguồn gốc từ dạ cỏ được làm giàu không được phân tích về tính đa dạng của quần xã. Fouts và các đồng tác giả (2012) đã báo cáo trong nghiên cứu của nhóm tác giả này về các quần thể trong dạ cỏ của mười hai con bò rằng tám mươi phần trăm vi khuẩn được nhận biết đến mức loài thuộc bộ *Clostridiales*, *Bacteroidales*, *Erysipelotrichales* và TM7 chưa được phân loại. Thành phần này là khác với thành phần của các quần thể có nguồn gốc từ MBM A1, C1, H1, P1, và S1 (Bảng 2), 94–98% của chúng bao gồm các vi khuẩn thuộc bộ *Clostridiales* (giống *Caloramator*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Garciella* và *Tissierella*).

Bàn luận

Căn cứ vào các thử nghiệm nêu trên, thấy rõ rằng mức độ amoni hoá khi sử dụng các quần thể hỗn hợp xác định sẽ được tạo ra với hiệu suất cao hơn so với các giải pháp kỹ thuật đã biết. Bằng cách sử dụng các quần thể đã được mô tả trên đây, đã thu được nồng độ amoniác đến 12 g/lít, tùy thuộc vào hàm lượng protein trong nguyên liệu ban đầu/môi trường được sử dụng. Hiệu suất amoni hoá được cải thiện ở mức khoảng 15-30 lần so với các giải pháp kỹ thuật đã biết. Thông thường, 50-80% nitơ toàn phần trong môi trường được thấy là được chuyển hoá thành amoniác trong thời gian khoảng 24-48 giờ.

Môi trường 100 dùng để minh họa cho quy trình amoni hoá các sản phẩm phụ/chất thải của lò mổ được thể hiện trên FIG.6. Nguyên liệu hữu cơ (các sản phẩm phụ) được bảo quản trong bộ phận chứa 106. Chất thải trong bộ phận chứa 106 được nạp vào lò phản ứng sinh học 104. Nước được thêm vào lò phản ứng sinh học 104 từ nguồn nước 102. Nguyên liệu cây được thêm vào lò phản ứng sinh học 104 từ nguồn 116. Loại nguyên liệu cây được chọn từ nhóm bao gồm H1, C1, P1, S1 và A1. Tốt hơn nếu nguyên liệu cây được trộn với quần thể S1. Lò phản ứng sinh học có thể có bộ phân trộn/khuấy 105 và bộ phận điều chỉnh mức gia nhiệt/nhiệt độ 110. Theo một số phương án, bộ phận gia nhiệt 110 được sử dụng để gia nhiệt các thành phần bên trong lò phản ứng sinh học 104 đến nhiệt độ khoảng 50°C (40-55°C đối với quần thể S1). Nếu cần, độ pH có thể được điều chỉnh bằng cách thêm bazơ (như NaOH) vào lò phản ứng sinh học 104 để duy trì độ pH ở mức lớn hơn 6. Tốt hơn nếu thời gian lên men là khoảng 16-48 giờ.

Trong quy trình lên men sử dụng quần thể vi khuẩn hỗn hợp, amoni/amoniác được giải phóng vào chất lỏng lên men. Có thể lấy các mẫu chất lỏng từ lò phản ứng sinh học 104 tại các thời điểm khác nhau để theo dõi diễn tiến của quy trình. Một thông số cần theo dõi là nồng độ amoniác/amoni trong chất lỏng này. Ví dụ, theo một số phương án nhất định của sáng chế, quy

trình lên men sẽ kết thúc hoặc diễn ra ở mức đủ nếu sự thay đổi về nồng độ amoniac/amoni giữa hai mẫu liên tiếp không cho thấy sự gia tăng đáng kể.

Toàn bộ hoặc một phần chất lỏng từ lò phản ứng sinh học 104 có thể đưa vào pha chưng cất 108, tại đó amoni/amoniac được chiết ra dưới dạng amoniac (NH_3) từ chất lỏng này. Amoni có thể được bảo quản trong bộ phận chứa 112 để sử dụng trong tương lai như dưới dạng một bộ phận của quy trình sản xuất phân bón chẳng hạn. Theo cách khác, một phần hoặc toàn bộ chất lỏng có thể được nạp vào bộ phận chứa 113 và được sử dụng trực tiếp làm phân bón.

Sau khi lấy ra toàn bộ hoặc một phần chất lỏng, các chất rắn và/hoặc chất lỏng còn lại có thể được thu hồi trong bộ phận bảo quản 114 để sử dụng trong tương lai. Ngoài ra, một phần nguyên liệu trong bộ phận bảo quản 114 cũng có thể được nạp lại vào lò phản ứng sinh học 104 và được sử dụng làm nguyên liệu cấy cho mẻ tiếp theo. Thêm vào đó, một phần các chất lỏng và/hoặc chất rắn có thể để lại trong lò phản ứng sinh học 104 để tạo nền cho mẻ tiếp theo.

Quá trình amoni hoá nguyên liệu từ thực vật chứa hydrat cacbon với hàm lượng cao có thể bị ức chế bởi quá trình axit hoá môi trường trong quy trình lên men. Có thể tránh được quá trình axit hoá môi trường bằng cách thêm bazơ (như NaOH) vào hỗn hợp nuôi cấy. Ngoài ra, nếu nguyên liệu từ thực vật và động vật được phối hợp với tỷ lệ thích hợp, thì có thể tránh được quá trình axit hoá và thu được hiệu suất tạo amoniac cao hơn.

Quá trình amoni hoá các nguyên liệu protein khác nhau có thể được tối ưu hoá bằng cách lựa chọn quần thể vi khuẩn hỗn hợp thích hợp. Như được thể hiện trong Bảng 3, hiệu suất amoni hoá của từng nguyên liệu phụ thuộc vào quần thể vi khuẩn được sử dụng. Ví dụ, các sản phẩm phụ của lợn/bò được amoni hoá với hiệu suất cao nhất khi sử dụng quần thể H1, trong khi các sản phẩm phụ của cá được amoni hoá với hiệu suất cao nhất khi sử dụng quần thể S1. Bình quân, quần thể H1 và S1 là các quần thể amoni hoá hữu hiệu nhất đối

với tất cả các nguyên liệu protein khác nhau, và H1 hoặc S1 cũng có thể được lựa chọn là quần thể được sử dụng để amoni hoá nguyên liệu bất kỳ.

S1 và các quần thể có nguồn gốc từ MBM là hữu hiệu để amoni hoá các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật khác nhau. Một số nguyên liệu nhất định trong số các nguyên liệu này có thể amoni hoá một cách hữu hiệu các quần thể tự nhiên khi được ủ trong các điều kiện tương tự được sử dụng để tạo ra các quần thể có nguồn gốc từ MBM. Tuy nhiên, tất cả các nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật đều không có quần thể amoni hoá. Dạ cỏ là nguồn chứa các vi khuẩn có khả năng tạo amoniac cao, song việc làm giàu một quần thể hỗn hợp có khả năng amoni hoá với hiệu suất tương tự với các quần thể có nguồn gốc từ MBM là điều không thể thực hiện. Các mẫu đất cũng có thể tạo ra các quần thể amoni hoá quần thể hữu hiệu và không hữu hiệu, tùy thuộc vào các điều kiện được sử dụng.

Nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C, chính xác hơn là từ 37 đến 55°C và độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 11, chính xác hơn là từ 6 đến 9, là tốt nhất để amoni hoá bằng vi khuẩn bởi các quần thể được mô tả ở đây. Cụ thể, nguyên liệu hữu cơ khi được cấy với quần thể vi khuẩn về cơ bản tương tự với S1 cho hiệu suất amoni hoá tốt. Thêm vào đó hoặc theo cách khác, việc cho nguyên liệu hữu cơ tiếp xúc với quần thể vi khuẩn bao gồm 53-91% quần thể toàn phần là *Sporanaerobacter acetigenes* và 8-34% là *Clostridium* spp. cũng cho hiệu suất amoni hoá tốt. Quá trình amoni hoá diễn ra cả trong điều kiện kỵ khí, vi ưa khí, và ưa khí khi sử dụng các quần thể hỗn hợp này.

Tham khảo tài liệu

Một số tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần mô tả sáng chế, mỗi tài liệu trong số này được đưa vào bằng cách trích dẫn toàn bộ nội dung của nó.

Tuyên bố về việc nộp lưu mẫu vật liệu sinh học

Mẫu nuôi cấy của (các) vật liệu sinh học dưới đây đã được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ quốc tế sau:

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Uppsalaalaan 8

3584 CT Utrecht

Hà Lan

trong các điều kiện đáp ứng quy định của Hiệp ước Budapest về công nhận quốc tế đối với việc nộp lưu vi sinh vật nhằm mục đích tiến hành các thủ tục đăng ký sáng chế.

Số hiệu lưu giữ quốc tế

Quần thể vi khuẩn hỗn hợp được nộp lưu	Số hiệu lưu giữ tại CBS	Ngày nộp lưu
S1	CBS 136063	22.08.2013

Tài liệu tham khảo

- Chen, G.J., Russell, J.B. 1989. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1052–1057.
- Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E., Rhoads, D. 2008a. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS ONE* 3(10): e3326.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., Rhoads, D.D., Wolcott, B.M., James, G.A., Wolcott, R.D. 2008b. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* 8: 43.
- EC. 2009. Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). *Off. J. Eur. Union* L300: 1-33.
- Eschenlauer, S.C.P., McKain, N., Walker, N.D., McEwan, N.R., Newbold, C.J., Wallace, R.J. 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4925-4931.
- EU. 2011. Commission regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from

veterinary checks at the border under that Directive. *Off. J. Eur. Union* L54: 1-354.

Fouts, D.E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R.C., MacNeil, M.D., Alexander, L.J., Nelson, K.E. 2012. Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS One* 7(11): e48289.

Krause, D.O., Russell, J.B. 1996. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 815–821.

Russell, J.B., Strobel, H.J., Chen, G.J. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 872–877.

Wolcott, R., Gontcharova, V., Sun, Y., Dowd, S.E. 2009. Evaluation of the bacterial diversity among and within individual venous leg ulcers using bacterial tag-encoded FLX and Titanium amplicon pyrosequencing and metagenomic approaches. *BMC Microbiology* 9: 226.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất amoniac hoặc amoni từ nguyên liệu hữu cơ, trong đó quy trình này bao gồm công đoạn:
 - lên men môi trường nước chứa nguyên liệu hữu cơ với sự có mặt của một quần thể vi khuẩn hỗn hợp có khả năng amoni hoá, trong lò phản ứng sinh học, trong đó công đoạn lên men này được thực hiện trong các điều kiện, và trong khoảng thời gian đủ, để tạo ra sản phẩm lên men chứa amoniac hoặc amoni;
 - trong đó nguyên liệu hữu cơ này chứa các hợp chất nitơ thích hợp để chuyển hoá thành amoniac hoặc amoni, và
 - trong đó quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được phân lập S1 (số hiệu lưu giữ CBS số (CBS Accession No.) 136063), trong đó quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự này có hệ số tương quan ít nhất là 0,90, so với S1 .
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó công đoạn lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 60°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 11.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó công đoạn lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 50°C và ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9.
4. Quy trình theo điểm 1, trong đó quần thể vi khuẩn hỗn hợp về cơ bản tương tự có hệ số tương quan ít nhất là 0,95 so với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được phân lập S1 (số hiệu lưu giữ CBS số 136063).
5. Quy trình theo điểm 1 trong đó công đoạn lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 55°C.
6. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm công đoạn thu hồi amoniac hoặc amoni từ sản phẩm lên men.

7. Quy trình theo điểm 6, trong đó amoniac hoặc amoni được thu hồi bằng phương pháp cơ học hoặc được làm kết tủa.
8. Quy trình theo điểm 6, trong đó amoniac hoặc amoni được thu hồi bằng các bước:
 - (a) tách các sản phẩm lên men rắn và lỏng;
 - (b) thu hồi sản phẩm lên men lỏng chứa amoniac hoặc nước chứa amoni hoặc thu hồi hỗn hợp khí được giải phóng trong quy trình lên men hoặc trong bước tách (a); và
 - (c) thu hồi amoniac hoặc amoni.
9. Quy trình theo điểm 1, trong đó các hợp chất nitơ là amin hoặc protein.
10. Quy trình theo điểm 1, trong đó nguyên liệu hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm bột thịt và xương (meat- and bone meal – MBM), bột động vật, sản phẩm phụ của động vật, chất thải lò mổ, nước sữa, chất thải đô thị, bột cá, thực phẩm và các loại chất thải của công nghiệp lên men và tổ hợp của chúng.
11. Quy trình theo điểm 10, trong đó chất thải của công nghiệp thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm phụ của động vật, bột động vật và chất thải thực phẩm.
12. Quy trình theo điểm 1, trong đó công đoạn lên men được thực hiện trong điều kiện kỵ khí.
13. Quần thể vi khuẩn hỗn hợp, trong đó quần thể vi khuẩn hỗn hợp này có hệ số tương quan ít nhất là 0,95 so với quần thể vi khuẩn hỗn hợp được phân lập S1 (số hiệu lưu giữ CBS số 136063).
14. Quần thể vi khuẩn hỗn hợp là quần thể vi khuẩn hỗn hợp được phân lập S1, được lưu ký tại Cơ quan Lưu ký Quốc tế của Hà Lan theo số hiệu lưu giữ CBS số 136063.

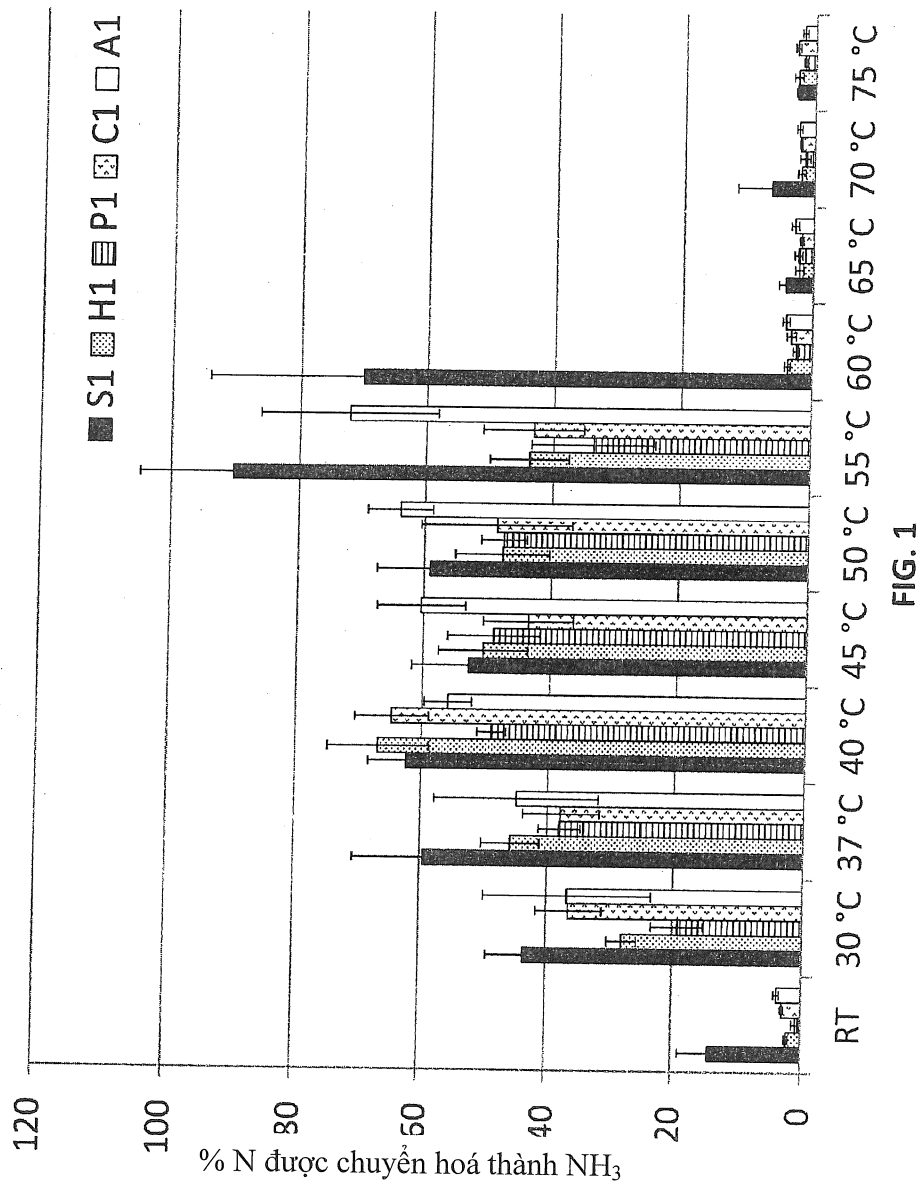


FIG. 1

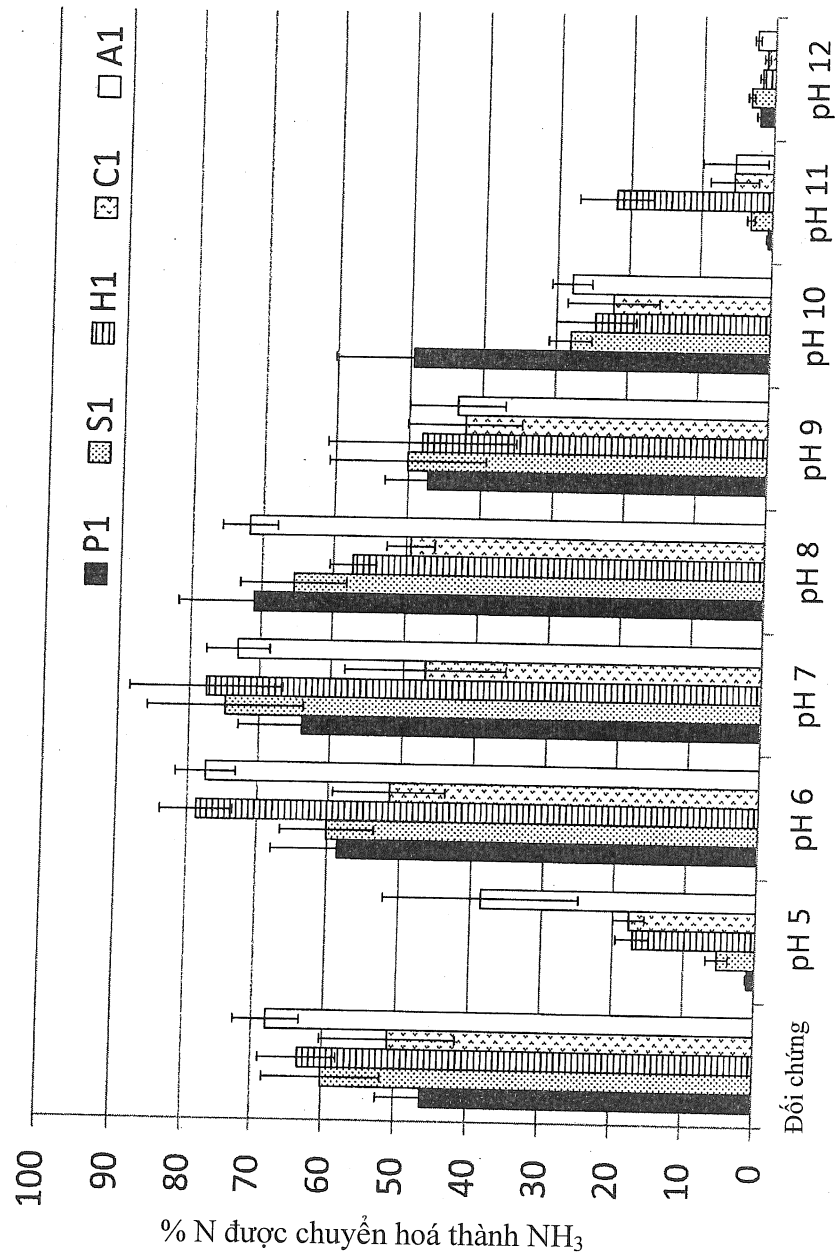


FIG. 2

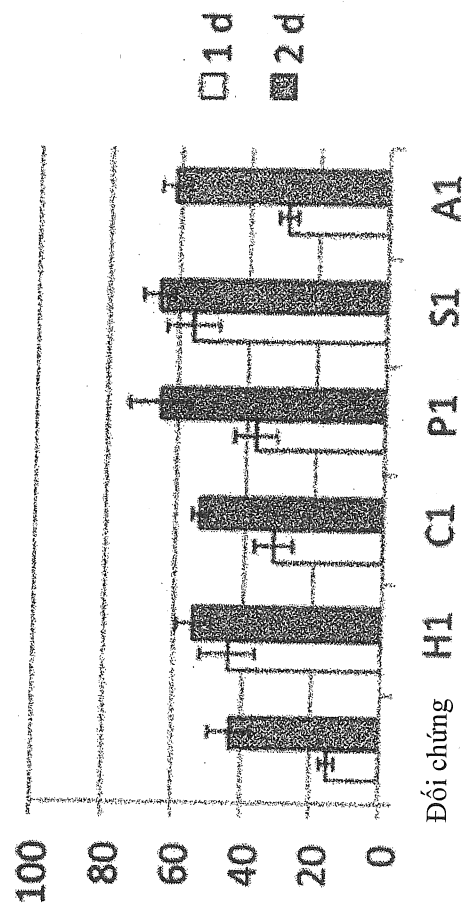


FIG 3A

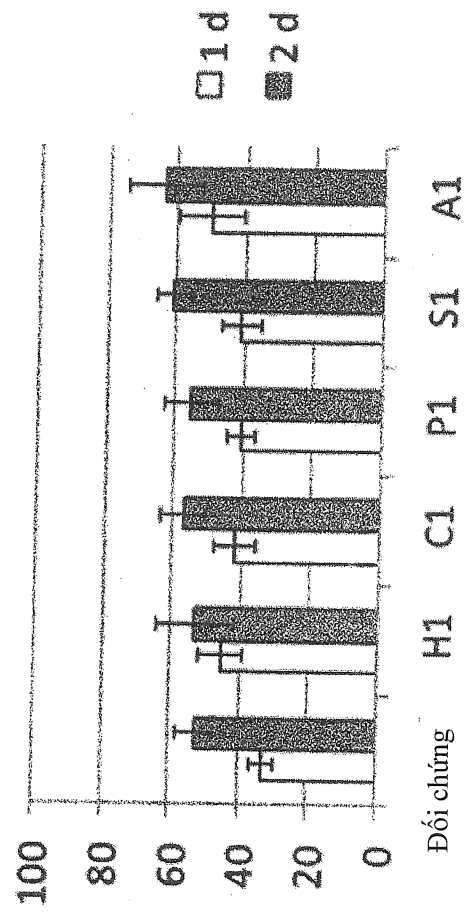


FIG. 3B

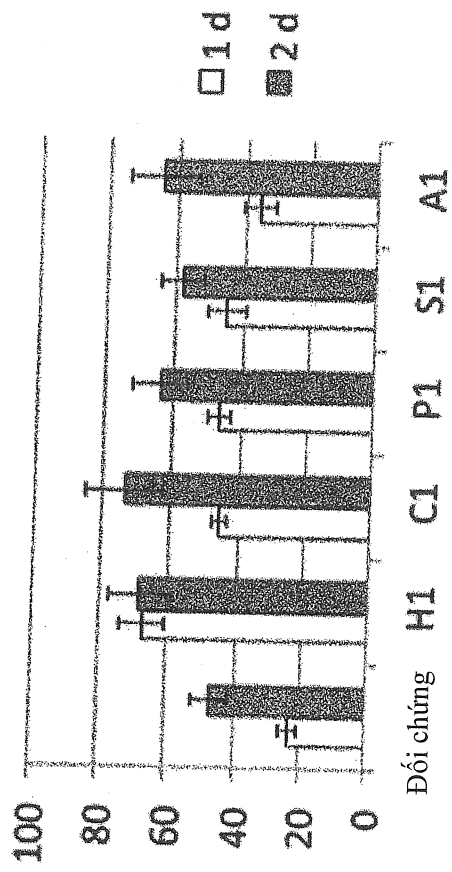


FIG. 3C

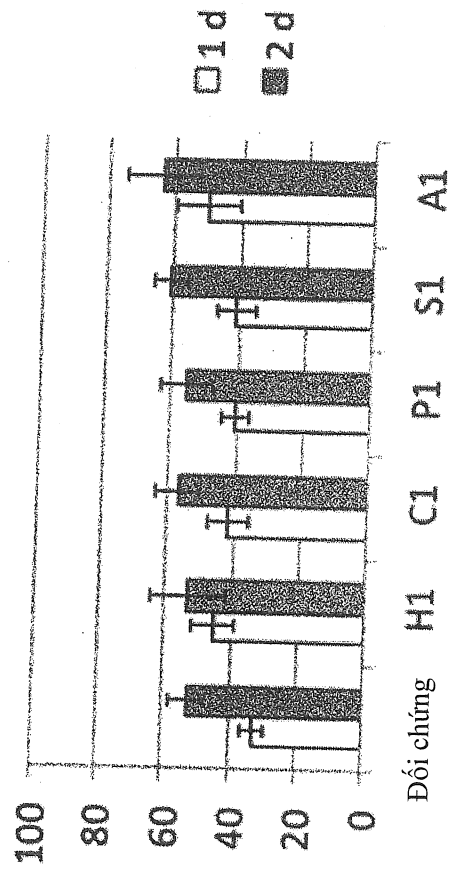


FIG. 3D

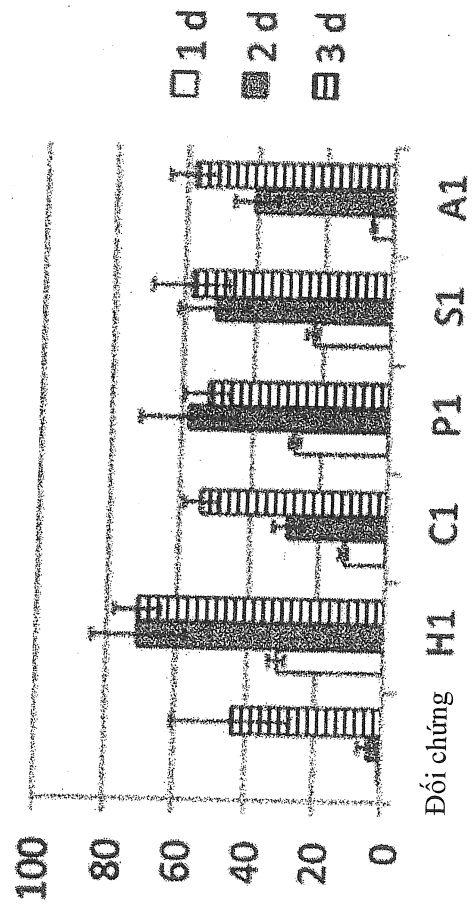


FIG. 3E

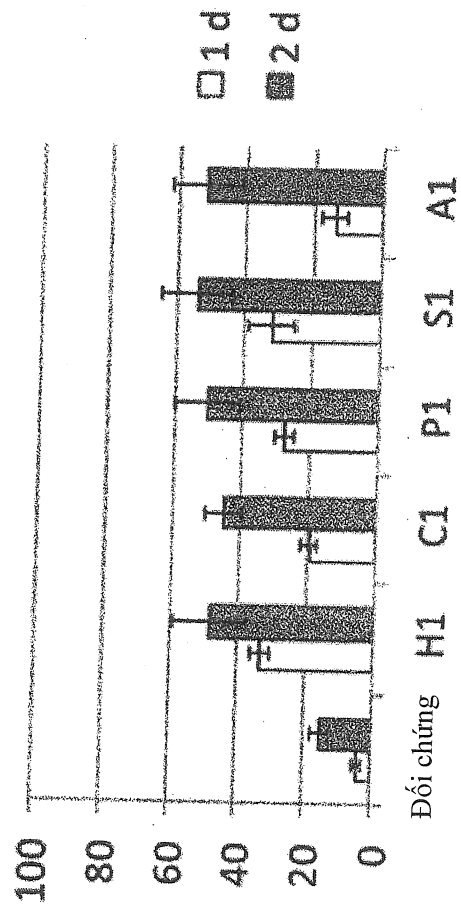


FIG. 3F

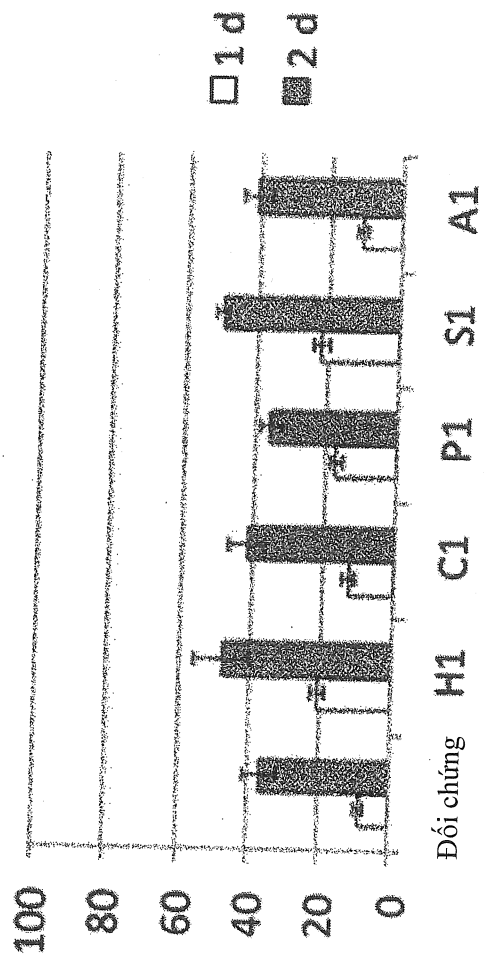


FIG 3G

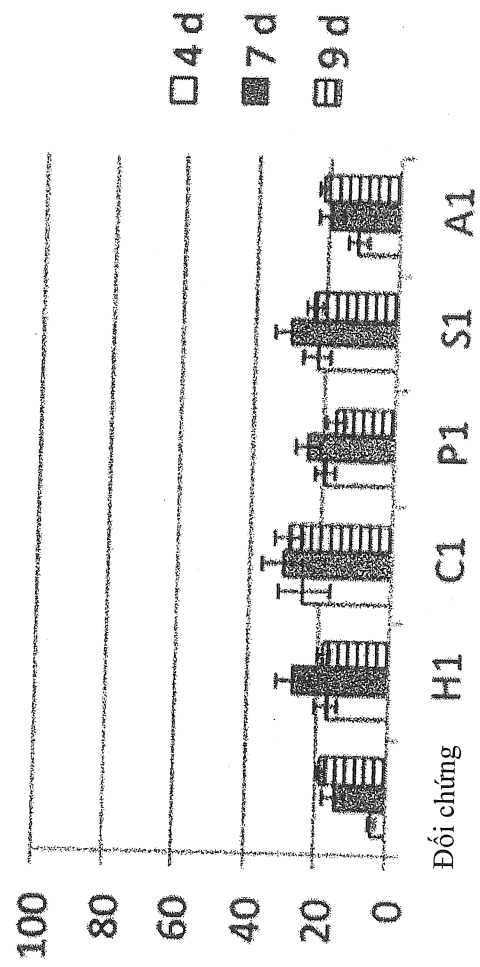


FIG. 3H

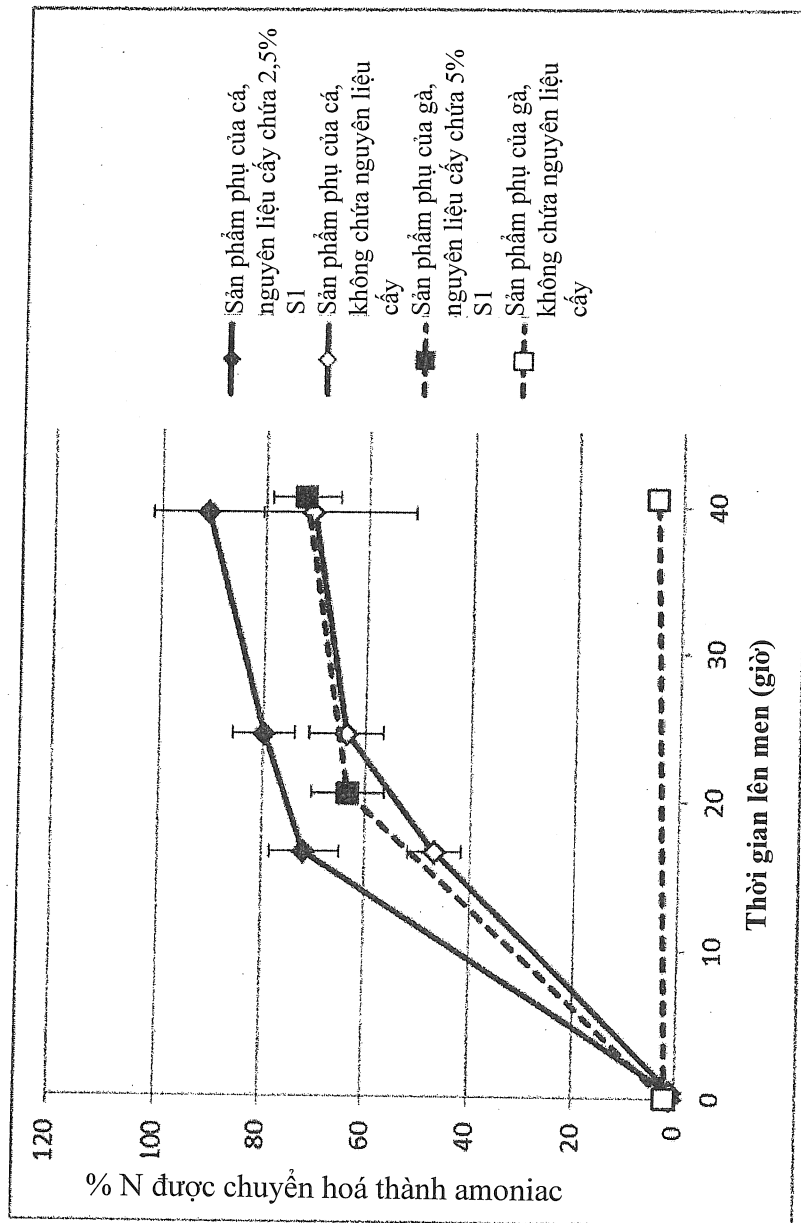


FIG. 4

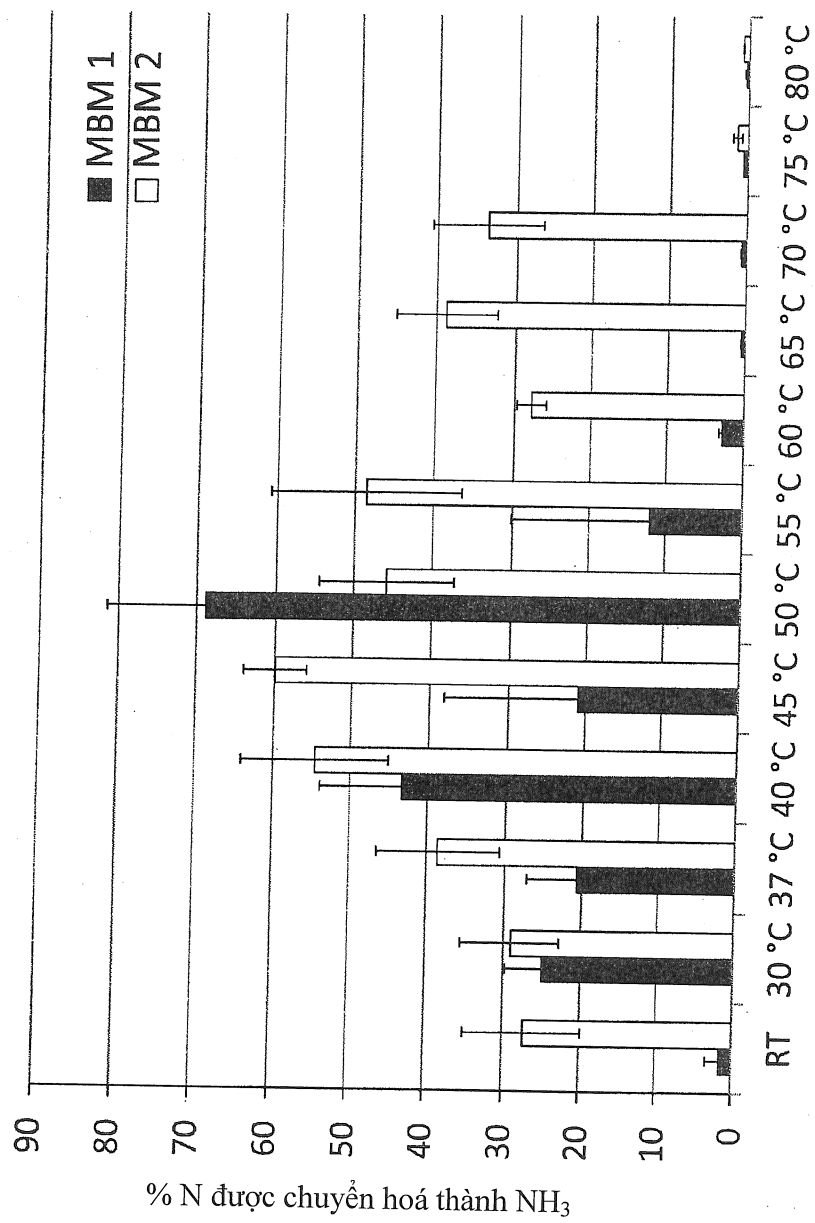


FIG. 5

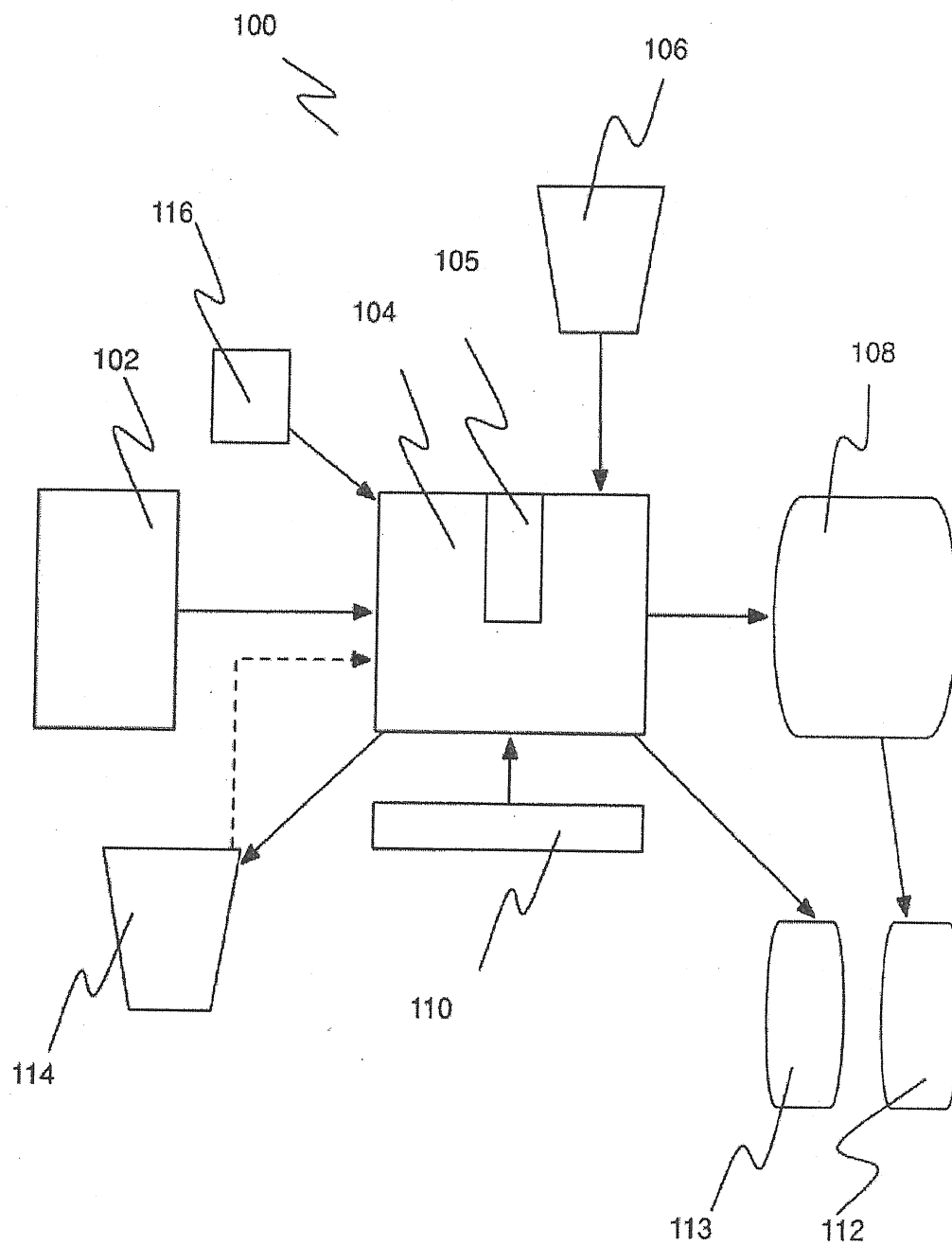


FIG. 6