



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

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

(11)



1-0023530

(51)⁷ A23K 1/10; C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2012-02166

(22) 20/12/2010

(86) PCT/EP2010/070285 20/12/2010

(87) WO2011/076759 30/06/2011

(30) 61/289,706 23/12/2009 US; 61/299,869 29/01/2010 US; 61/355,365
16/06/2010 US

(45) 27/04/2020 385

(43) 26/11/2012 296A

(73) AGRINOS AS (NO)

Fornebuveien 1, N-1366 Lysaker, Norway

(72) LÓPEZ-CERVANTES, Jamie (MX); SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia Isabel (MX);
ROCHIN, Karl Reiner Fick (MX)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM VI SINH VÀ QUY TRÌNH PHÂN GIẢI SINH HỌC SỬ DỤNG CHẾ
PHẨM VI SINH NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh mới và các quy trình phân giải sinh học để xử lý
động vật biển hoặc các sản phẩm phụ của động vật biển để tạo ra các phần rắn, phần lỏng
và phần lipid chứa các hợp chất hữu dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến chế phẩm vi sinh mới và quy trình vi sinh để xử lý các sản phẩm phụ của động vật biển, và trong một số trường hợp cả toàn bộ động vật biển, để tạo ra các phần rắn, phần lỏng và phần lipid chứa các hợp chất hữu dụng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc chế biến cá và các động vật chân đốt biển, như tôm, cua và tôm nước ngọt, tạo ra lượng lớn sản phẩm phụ từ biển. Hầu hết các sản phẩm phụ này được sử dụng trong các thành phẩm giá trị thấp như phân bón, thức ăn cho cá hoặc thức ăn cho vật nuôi, nhưng các sản phẩm phụ không được sử dụng gây ra gánh nặng kinh tế cho ngành công nghiệp chế biến thủy sản do nhu cầu loại bỏ các phế liệu này theo cách thân thiện với môi trường. Theo một số dự tính, các sản phẩm phụ này chiếm đến 25% tổng sản lượng của ngành công nghiệp cá.

Ví dụ, trong quá trình chế biến tôm cho bước tiếp theo là làm đông lạnh rồi đưa ra thị trường, lượng lớn phế liệu được tạo ra vì 35% con tôm không ăn được và phải loại bỏ. Các phế liệu hoặc các sản phẩm phụ này là phần đầu ngực và bộ xương ngoài của con tôm. Tuy nhiên, các sản phẩm phụ này của con tôm giàu các chất có giá trị cao như kitin, protein, chất béo, các chất màu carotenoit (astaxantin) và các chất khoáng. Phần lớn các sản phẩm phụ không ăn được được loại bỏ khi vào đất liền hoặc đổ xuống biển, do đó gây ra các vấn đề nghiêm trọng về mặt môi trường và hao tổn đáng kể đối với ngành công nghiệp chế biến tôm. Hiện nay, chỉ một lượng nhỏ các sản phẩm phụ này được sử dụng làm chất bổ sung cho thức ăn chăn nuôi.

Kỹ thuật chung nhất để sử dụng sản phẩm phụ của tôm là phơi nắng. Kỹ thuật này kiểm soát vệ sinh kém và các sản phẩm này được sử dụng chủ yếu cho động vật. Các phương pháp khác sử dụng các hóa chất axit và kiềm ở các nồng độ khác nhau, nhiệt độ khác nhau và thời gian khác nhau để chiết kitin và thu hồi các sản phẩm thủy phân protein. Tuy nhiên, các phương pháp này gây khử trùng hợp và khử axetyl không

hoàn toàn đối với kitin. Hơn nữa, các phương pháp này làm phức tạp việc thu hồi các sản phẩm khác, như protein và chất màu.

Các phương pháp enzym đã được phát triển để chiết kitin, các sản phẩm thủy phân lipid và các chất màu. Các phương pháp này sử dụng các phản ứng enzym hoặc phản ứng phân tách enzym. Các nghiên cứu khác đã thông báo việc sử dụng enzym của vi sinh vật, như alcalase thương phẩm, để chiết protein ra khỏi các sản phẩm phụ của tôm và động vật biển. Việc kết hợp alcalase và pancreatin để chiết kitin, protein thủy phân và các lipid màu đã được thông báo.

Các quy trình lên men lactic đã được áp dụng làm phương án thay thế cho các quy trình hóa học và các quy trình enzym nêu trên. Kỹ thuật lên men là kinh tế mà làm ổn định và duy trì chất lượng dinh dưỡng của các sản phẩm phụ. Các điều kiện tối ưu để lên men phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm sự lựa chọn và nồng độ của hydrat cacbon, độ pH, nhiệt độ, thời gian, và sự lựa chọn các điều kiện hiếu khí hoặc các điều kiện kỵ khí. Yếu tố quan trọng khác là sự lựa chọn vi sinh vật và nồng độ nguyên liệu cấy ban đầu. Để tạo điều kiện thuận lợi cho quy trình lên men các sản phẩm phụ của tôm, giống cấy tinh khiết chỉ gồm vi khuẩn axit lactic (lactic acid bacteria - LAB) được sử dụng. LAB bao gồm *Lactobacillus plantarum* (Rao, M.S., Stevens, W.F., 2006, "Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production," *Food Technology and Biotechnology* 44, 83-87; Rao, M.S., Muñoz, J., Stevens, W.F., 2000, "Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste," *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 808-813; Bhaskar, N., Suresh, P.V., Sakhare, P.Z., Sachindra, N.M., 2007, "Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery," *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1427-1434), *Lactobacillus sp. B2* (Cira, L.A., Huerta, S., Hal, G.M., Shirai, K., 2002, "Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery," *Process Biochemistry* 37, 1359-1366; Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, R.O., Hall, G.M., 2001, "Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation," *Enzyme and*

Microbial Technology 28, 446-452), *Lactobacillus casei* (Shirai 2001), *Lactobacillus paracasei* (Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, Y.J., Oh, K.T., Park, R.D., 2007, “Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3,” *Carbohydrate Polymers* 68, 746-750), *Lactobacillus pentosus* (Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F., Vega, J., 2001, “Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production,” *Process Biochemistry* 37, 229-234; Shirai 2001), *Lactobacillus acidophilus* B4495 and *Lactobacillus lactis* (Bhaskar 2007), *Lactobacillus salvarus* (Beaney 2005), *Enterococcus faecium* (Beaney 2005), *Pediococcus acidilactici* (Bhaskar 2007) và *Pediococcus* sp. L1/2 (Choorit, W., Patthanamane, W., Manurakchinakorn, S., 2008, “Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells,” *Biores. Technol.* 99, 6168-6173). Ngoài ra, hỗn hợp gồm bốn LAB đã được sử dụng (Bhaskar 2007) và đã có thông báo về việc sử dụng *Lactobacillus* kết hợp với *Serratia marcescens* FS-3 (Jung 2007) hoặc *Staphylococcus carnosus* (Shirai 2001). Tuy nhiên, việc áp dụng các quy trình lên men này ở quy mô công nghiệp không thành công do hiệu quả kém của các giống cấy công nghiệp.

Việc lên men lactic các sản phẩm phụ của tôm tạo ra các sản phẩm thủy phân protein, kitin, các chất khoáng, và chất béo. Kitin và các chất dẫn xuất khử axetyl của nó có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, y sinh học, công nghiệp thực phẩm và công nghiệp giấy, trong khi sản phẩm thủy phân lỏng là nguồn tuyệt vời chứa các axit amin thiết yếu mà có thể được sử dụng cho người hoặc động vật. Bột nhão lipid chứa sterol, vitamin A và E, và các chất màu carotenoid như astaxanthin mà có thể được sử dụng trong thức ăn cho cá hồi hoặc làm chất màu tự nhiên trong công nghiệp thực phẩm.

Kitin là polysaccharit tự nhiên chỉ được tìm thấy ở bộ xương ngoài của các loài giáp xác, lớp biểu bì của côn trùng, và thành tế bào nấm mốc. Do kitin là một trong số các polyme sinh học phổ biến nhất, các ứng dụng trong y sinh, trong công nghệ sinh học và trong công nghiệp của nó đã được quan tâm một cách đặc biệt. Chitosan là hợp chất poly-(β -1-4)-N-axetyl-D-glucosamin tạo ra được bằng cách khử axetyl hóa kitin (β -1-4)-N-axetyl-D-glucosamin. Glucosamin là amino monosaccharit thu được bằng cách khử polyme hóa chitosan. Hợp chất này tham gia vào việc cấu thành các

glycosaminoglycan, là nhóm polysacarit phức ngoại bào chính. Glucosamin sulphat, glucosamin hydroclorua và N-axetyl-glucosamin thường được sử dụng riêng rẽ hoặc là một phần của hỗn hợp.

Nói chung, sản phẩm thủy phân lỏng chứa lượng lớn các axit amin thiết yếu, biểu thị giá trị dinh dưỡng cao giải thích cho việc sử dụng nó làm chất bổ sung dinh dưỡng cho động vật và trong nuôi trồng thủy sản hoặc làm nguồn nitơ trong môi trường sinh trưởng cho vi sinh vật. Ngoài ra, các sản phẩm thủy phân này còn là nguồn axit amin tự do và có thể được sử dụng làm tác nhân kích thích sinh học để nuôi dưỡng thực vật.

Astaxantin (3,3'-đihydroxy- β,β -caroten-4,4'-đion), là ketocarotenoid thu được từ β -caroten bị oxy hóa, trong tự nhiên được tìm thấy ở các sinh vật biển và các sinh vật thủy sinh thông thường. Do có màu hồng hấp dẫn, có chức năng sinh học làm tiền chất vitamin A, và hoạt tính chống oxy hóa, nên astaxantin có thể được sử dụng làm chất tạo màu trong thực phẩm và trong dược phẩm. Trong cấu trúc của astaxantin, tìm thấy hai nguyên tử cacbon không đối xứng giống nhau ở vị trí C3 và C3'. Tuy nhiên, *trans*-asthaxanthin là carotenoid phổ biến nhất về mặt định lượng trong các loài giáp xác.

Các tài liệu bộc lộ các sản phẩm này và các sản phẩm khác của quá trình lên men lactic bao gồm: Sanchez-Machado et al. "Quantification of organic acids in fermented shrimp waste by HPLC" *Food Technology and Biotechnology*, volume 46, 456 (2008); Sanchez-Machado et al. "High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for quantitation of tryptophan and Tyrosin in a shrimp waste protein concentrate", *Journal of Chromatography B*, volume 863, 88 (2008); Lopez-Cervantes et al., "Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC" *Journal of Chromatographic Science*, volume 45, 1 (2007); Lopez-Cervantes et al., "Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC" *Biomedical Chromatography*, volume 20, 981 (2006); Lopez-Cervantes et al., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate" *Journal of Chromatography A*, volume 1105, 1-2 (2006); Lopez-Cervantes et al., "Analysis of

free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, volume 1105, 1 (2006).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh và quy trình phân giải sinh học.

Một chế phẩm vi sinh chứa (a) một hoặc nhiều vi khuẩn axit lactic (LAB) và (b) một hoặc nhiều hoặc hai hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm các giống *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* và *Proteus*. Theo các phương án được ưu tiên, ít nhất là một trong số các chủng *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* và *Proteus* là chủng phân giải kitin vì tạo ra kitinaza (ví dụ, endokitinaza và/hoặc exokitinaza). Trong một số chế phẩm vi sinh, LAB được chọn trong số các giống bao gồm *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, và *Streptococcus*. Nếu LAB là *Lactobacillus*, tốt hơn nếu LAB là *Lactobacillus acidophilus* và/hoặc *Lactobacillus casei*, tốt hơn nữa là *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) và *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Bacillus* trong chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus thuringiensis*, tốt hơn nữa là *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008) và *Bacillus thuringiensis* các chủng HD-1 và HD-73 (SILoSil® BT).

Tốt hơn, nếu *Azotobacter* trong chế phẩm này là *Azotobacter vinelandii*, tốt hơn nữa là *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Trichoderma* trong chế phẩm này là *Trichoderma harzianum*, tốt hơn nữa là *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL).

Tốt hơn, nếu *Rhizobium* trong chế phẩm này là *Rhizobium japonicum*, tốt hơn nữa là *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Clostridium* trong chế phẩm này là *Clostridium pasteurianum*, tốt hơn nữa là *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Pseudomonas* trong chế phẩm này là *Pseudomonas fluorescens*, tốt hơn nữa là *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh khác chứa một hoặc nhiều hoặc hai hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* ((SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* các chủng HD-1 và HD-73 (SILoSil® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus* (Bioderpac, 2008).

Theo phương án khác, chế phẩm vi sinh chứa *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) và/hoặc *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh được đặc biệt ưu tiên chứa các chủng *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* HD-1 và HD-73, *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh được ưu tiên là HQE. HQE được lưu giữ tại ở Bộ Sưu tập Giống Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC) Manassas, VA, USA ngày 27/4/2010 và được cấp số hiệu lưu giữ để đăng ký sáng chế PTA-10861.

Các vi sinh vật phân lập được được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* các chủng HD-1 và HD-73(SILoSil® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus* (Bioderpac, 2008) cũng được bộc lộ.

Quy trình phân giải sinh học bao gồm bước trộn động vật biển hoặc sản phẩm phụ của động vật biển với chế phẩm vi sinh bất kỳ trong số các chế phẩm vi sinh nêu trên để tạo ra hỗn hợp; lên men hỗn hợp này; và tách hỗn hợp này thành các phần rắn, phần trong nước và phần lipid. Khác với các quy trình phân giải sinh học đã biết, quy trình phân giải sinh học theo sáng chế tạo ra chitosan và glucosamin mà có thể được tìm thấy trong phần trong nước. Tốt hơn, nếu động vật biển là động vật chân đốt biển, như tôm, tôm nước ngọt, cua hoặc loài nhuyễn thể. Theo một số phương án, động vật biển là cá hoặc sản phẩm phụ của cá như da cá, thịt cá hoặc cơ quan của cá.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện quy trình phân giải được ưu tiên đối với các sản phẩm phụ của tôm.

Fig. 2 là đồ thị thể hiện độ pH và tổng độ axit chuẩn độ được trong quá trình lên men lactic các sản phẩm phụ của tôm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “động vật biển” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ động vật bất kỳ sống ở đại dương, biển hoặc nước ngọt. Động vật biển bao gồm cả cá và các động vật chân đốt biển.

Thuật ngữ “động vật chân đốt biển” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ động vật biển không xương sống có bộ xương ngoài mà sống ở đại dương, biển hoặc

nước ngọt. Các động vật chân đốt biển thường có phần thân phân khúc, và các phần phụ nối với nhau. Các động vật chân đốt biển là thành viên của ngành phụ *Crustacea*. Các nhóm *Crustacea* được ưu tiên bao gồm *Branchiopoda* (ví dụ, tôm nước mặn, *Cladocera* và *Triops*), *Cephalocardia* (ví dụ, tôm hình móng ngựa), *Maxillopoda* (ví dụ, nhóm chân râu và động vật chân chèo (động vật nổi)), *Ostracoda* (ví dụ, phụ lớp vỏ cứng) và *Malacostraca* (ví dụ, cua, tôm hùm, tôm, loài nhuyễn thể, v.v.).

Thuật ngữ “sản phẩm phụ” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phần bất kỳ của động vật biển. Theo một số phương án, sản phẩm phụ được tạo ra bằng cách chế biến công nghiệp động vật biển. Ví dụ, trong ngành công nghiệp chế biến tôm, phần đầu ngực và bộ xương ngoài là các sản phẩm phụ của tôm. Trong ngành công nghiệp chế biến cua và tôm hùm, bộ xương ngoài (vỏ) là sản phẩm phụ.

Theo một số phương án, toàn bộ động vật chân đốt có thể được sử dụng trong quy trình phân giải sinh học. Ví dụ, nhiều loài nhuyễn thể khi trưởng thành dài khoảng từ 1 đến 2 xăng ti met (từ 0,4 đến 0,8 inso) nhưng một vài loài sinh trưởng đến kích thước nằm trong khoảng từ 6 đến 15 xăng ti met (từ 2,4 đến 5,9 inso). Dầu của loài nhuyễn thể chứa ít nhất là ba thành phần: (1) các axit béo omega-3 tương tự như các axit này trong dầu cá, (2) các axit béo omega-3 liên hợp với các phospholipit và (3) chất chống oxy hóa astaxanthin. Ngoài ra, bộ xương ngoài chứa florua. Do vậy, các thành phần này có thể được tách ra trong quy trình phân giải sinh học sao cho thành phần dầu được tách ra trong phần mỡ và florua được tách ra trong phần lỏng.

Thuật ngữ “chế phẩm vi sinh” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ môi trường lỏng, rắn hoặc dạng gelatin chứa hoặc đỡ một cách vật lý một hoặc nhiều vi sinh vật, tốt hơn là hai hoặc nhiều vi sinh vật. Các chế phẩm vi sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dịch lên men chứa một hoặc nhiều vi sinh vật và giống cấy mà thường được sử dụng để môi dịch lên men và chứa vi sinh vật ở nồng độ cao hơn nồng độ trong dịch lên men. Các chế phẩm vi sinh chứa các loài/chủng thường được gọi là “Các chế phẩm vi sinh Bioderpac”, để chỉ chế phẩm chứa một hoặc nhiều vi sinh vật hoặc kết hợp một hoặc nhiều vi sinh vật với các vi sinh vật khác.

Thuật ngữ “vi sinh vật phân lập được” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ môi trường lỏng, rắn hoặc dạng gelatin chứa hoặc đỡ một cách vật lý một vi sinh vật.

Các chế phẩm vi sinh được bộc lộ hoặc các vi sinh vật phân lập được có thể được kết hợp với các vi sinh vật khác để tạo ra chế phẩm vi sinh mới mà có thể được sử dụng cho các quy trình khác với quy trình theo sáng chế. Việc lựa chọn (các) vi sinh vật đã được bộc lộ phụ thuộc vào các đặc tính sinh học của nó (ví dụ, sản lượng các enzym phân giải protein hoặc hydrat cacbon hoặc kitin), các vi sinh vật khác được chọn và quy trình có áp dụng kết hợp. Việc lựa chọn các thành phần và quy trình này là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo phần bộc lộ trong bản mô tả này.

Một chế phẩm vi sinh chứa (a) một hoặc nhiều vi khuẩn axit lactic (LAB) và (b) một hoặc nhiều hoặc hai hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm các giống *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*., *Micrococcus*, *Nitrobacter* và *Proteus*. Theo các phương án được ưu tiên ít nhất là một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều hoặc ba hoặc nhiều trong số *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*., *Micrococcus*, *Nitrobacter* và *Proteus* là chủng phân giải kitin vì tạo ra kitinaza (ví dụ, endokitinaza và/hoặc exokitinaza). Trong một số chế phẩm vi sinh, LAB được chọn trong số các giống *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, và *Streptococcus*. Nếu LAB là *Lactobacillus*, thì tốt hơn nếu LAB là *Lactobacillus acidophilus* và/hoặc *Lactobacillus casei*, tốt hơn nữa là *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) và *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Bacillus* trong chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm các chủng *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus thuringiensis*, tốt hơn nữa là *Bacillus subtilis* (SILOSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008) và *Bacillus thuringiensis* HD-1 và HD-73 (SILOSil® BT).

Tốt hơn, nếu *Azotobacter* trong chế phẩm này là *Azotobacter vinelandii*, tốt hơn nữa là *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Trichoderma* trong chế phẩm này là *Trichoderma harzianum*, tốt hơn nữa là *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL).

Tốt hơn, nếu *Rhizobium* trong chế phẩm này là *Rhizobium japonicum*, tốt hơn nữa là *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Clostridium* trong chế phẩm này là *Clostridium pasteurianum*, tốt hơn nữa là *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008).

Tốt hơn, nếu *Pseudomonas* trong chế phẩm này là *Pseudomonas fluorescens*, tốt hơn nữa là *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh khác chứa một hoặc nhiều hoặc hai hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm các chủng *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* HD-1 và HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus* (Bioderpac, 2008).

Theo phương án khác, chế phẩm vi sinh chứa *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) và/hoặc *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh được đặc biệt ưu tiên chứa các chủng *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* HD-1 và HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus* (Bioderpac, 2008).

Chế phẩm vi sinh được ưu tiên để sử dụng trong quy trình phân giải sinh học là HQE. HQE được lưu giữ ở Bộ Sưu tập Giống Mỹ (ATCC) Manassas, VA, USA ngày

27/4/2010 và được cấp số hiệu lưu giữ để đăng ký sáng chế PTA-10861. HQE là quần hợp vi sinh tạo nên bởi các vi sinh vật thu được từ đất phì nhiêu và các vi sinh vật từ các nguồn thương mại. Các vi sinh vật tạo nên các nguồn thương mại bao gồm *Bacillus subtilis*(SILoSil® BS), *Bacillus thuringiensis* các chủng ND-1 và HD-73(SILoSil® BT) và *Trichoderma harzianum*, đều thu được từ Biotecnologia Agroindustrial S.A. DE C.V., Morelia, Michoacan, các vi sinh vật Mexico được gọi là “Bioderpac 2008” theo chủng hoặc loài và chủng có thể thu được từ HQE. Tuy nhiên, phân nhóm phụ vi sinh vật trong HQE cũng có thể được sử dụng. Các vi sinh vật *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus thuringiensis* (SILoSil® BT) và *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) tạo ra các enzym phân giải kitin mà là đặc biệt quan trọng khi bắt đầu quá trình phân giải sinh học. Các enzym phân giải kitin tham gia phân giải kitin chứa các phần rắn mà có thể cản trở bước phân giải tiếp theo. Các sinh vật này còn tạo ra proteaza, lipaza và các enzym khác tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân giải protein, chất béo và hydrat cacbon.

Thuật ngữ “HYTb được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phần trong nước thu được từ quy trình phân giải sinh học. HYTb thường chứa các axit amin (khoảng từ 3% trọng lượng đến 12% trọng lượng, thường là khoảng 12% trọng lượng), chitosan (khoảng 1,2% trọng lượng), glucosamin (khoảng 1% trọng lượng) và các nguyên tố vi lượng (khoảng 6% trọng lượng) bao gồm canxi, magie, kẽm, đồng, sắt và mangan. Lượng chitosan có thể nằm trong khoảng từ 0,5% trọng lượng đến 1,5% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,0% trọng lượng đến 1,5% trọng lượng. Lượng glucosamin có thể nằm trong khoảng từ 0,5% trọng lượng đến 1,5% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,0% trọng lượng đến 1,5% trọng lượng. Tổng lượng chitosan và glucosamin nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5% trọng lượng. HYTb còn chứa các enzym như các enzym lactic, proteaza, lipaza, kitinaza, axit lactic, polypeptit và hydrat cacbon khác. Trọng lực riêng của HYTb thường nằm trong khoảng từ 1,050 đến 1,054. Hàm lượng axit amin trung bình của HYTb đối với một số axit amin nhất định được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Hàm lượng axit amin trong các sản phẩm thủy phân dạng bột khô
(mg/g trọng lượng khô)

<i>Axit amin</i>	<i>Các sản phẩm thủy phân dạng bột khô</i>
Axit aspartic	38
Axit glutamic	39
Serin	16
Histidin*	9
Glyxin	28
Threonin*	14
Alanin	36,1
Prolin	25,8
Tyrosin*	70
Arginin	22,2
Valin*	20
Metionin*	16,4
Isoleuxin*	18,3
Tryptophan*	3,1
Leuxin*	23
Phenylalanin*	39
Lysin*	13
<i>Tổng cộng</i>	431
<i>*Các axit amin thiết yếu</i>	226

HYTb thường được tạo ra bằng cách ly tâm sản phẩm lên men thu được bởi sản phẩm của quá trình phân giải sinh học. Khi quy trình phân giải sinh học diễn ra, các chất dinh dưỡng đối với các vi sinh vật dùng cho quy trình phân giải sinh học, ví dụ, HQE, được phân giải hết và độ pH giảm do axit sinh ra trong quá trình lên men. Điều này khiến cho các vi sinh vật trong sản phẩm lên men chết hoặc không hoạt động. Tùy theo trọng lực và thời gian của bước ly tâm sản phẩm lên men, các vi sinh vật này có thể được tìm thấy trong HYTb. Do vậy, HYTb có thể bao gồm một hoặc nhiều thành

phần bất kỳ trong số các thành phần nêu trên, ví dụ, chitosan và glucosamin, kết hợp với toàn bộ hoặc một phần thành phần vi sinh hiện có của quá trình lên men khi dừng lại. Theo cách khác, bước ly tâm có thể được thực hiện đến khi hầu như toàn bộ thành phần vi sinh bị phân giải ra khỏi HYTb. Trong các trường hợp đó, thành phần vi sinh có thể bị ly tâm vào phần HYTc. Theo cách khác, HYTc có thể được tách ra khỏi HYTb bằng cách ly tâm với vận tốc thấp. Lúc đó, HYTb có thể được ly tâm để tạo ra viên chứa vi sinh vật và dung dịch nước HYTb không chứa vi sinh vật.

Thuật ngữ “HYTc” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phần rắn thu được từ quy trình phân giải sinh học. Thành phần chính của HYTc là kitin. Chất này thường có phân tử lượng trung bình khoảng 2300 dalton và chiếm khoảng 64% trọng lượng chế phẩm. HYTc chứa khoảng 6% các chất khoáng bao gồm canxi, magie, kẽm, đồng, sắt và mangan, khoảng 24% trọng lượng protein và 6% nước. Nó có trọng lực riêng khoảng 272kg/m³. Kitin trong HYTc thường chứa các vi sinh vật từ sản phẩm lên men kèm theo nó. Các vi sinh vật phân giải kitin có xu hướng kết hợp với kitin rắn. Điều này được đưa ra trên cơ sở ái lực của các vi sinh vật phân giải kitin đối với cơ chất kitin. Do vậy, HYTc còn có thể chứa các vi sinh vật phân giải kitin trừ khi thực hiện các bước loại bỏ chúng. Trong trường hợp HQE, các vi sinh vật phân giải kitin này bao gồm một hoặc nhiều vi sinh vật sản sinh kitinaza và/hoặc exokitinaza nêu trên. Các vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Bacillus subtilis*(SILoSIL® BS)*Bacillus thuringiensis* các chủng HD-1 và HD-73(SILoSIL® BT), và *Trichoderma harzianum*(TRICHOSIL). Các vi sinh vật phân giải kitin có thể được loại ra khỏi kitin rắn bằng cách tiệt trùng, thanh trùng hoặc rửa kitin bằng các hợp chất kháng khuẩn như xà phòng hoặc clo. HYTc còn có thể chứa các vi sinh vật khác nữa có mặt vào cuối quy trình phân giải sinh học do sự có mặt của sản phẩm lên men còn lại hoặc ly tâm HYTb.

Quản hợp HQE

Các vi sinh vật sau trong HQE được tin là tham gia vào quy trình phân giải sinh học và các đặc tính đã biết của chúng. Trong một số trường hợp, chủng vi sinh được xác định là “Bioderpac, 2008”. Khi không biết loài, thì loài và chủng được xác định là “Bioderpac, 2008”.

HQE được lưu giữ ở ATCC ngày 27/4/2010 và được cấp số hiệu lưu giữ để đăng ký sáng chế PTA-10861.

Bacillus subtilis (SILoSil® BS) là vi khuẩn Gram dương ưa nhiệt trung bình và sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 25 đến 35°C. Vi khuẩn này hiếu khí và có thể sinh trưởng trong điều kiện yếm khí và sử dụng nhiều loại nguồn cacbon. Vi khuẩn này có hai nitrat reductaza, một trong số chúng được sử dụng cho quá trình đồng hóa nitơ. Vi khuẩn này có khả năng tiết ra amylaza, proteaza, pululanaza, kitinaza, xylanaza và lipaza.

Bacillus thuringiensis (Các chủng HD-1 và HD-73 (SILoSil® BT)) là vi khuẩn Gram dương yếm khí không bắt buộc, ở dạng lông roi có vành lông rung. Các chủng HD-1 và HD-73 tổng hợp các tinh thể có dạng hình học phong phú có hoạt tính protein và trù sâu trong giai đoạn bào tử. Các chủng HD-1 và HD-73 tiết ra các exochitinaza khi ở trong môi trường chứa kitin và có thể được sử dụng cho quá trình phân giải phế liệu của động vật giáp xác trong quá trình sản xuất chitooligosacarit.

Bacillus cereus (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn hiếu khí không bắt buộc, Gram dương, và tạo bào tử. Nó ưa nhiệt trung bình và sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C. Nó tạo ra các chất kháng sinh zwittermixin A và kanosamin.

Bacillus licheniformis (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương, có thể vận động, tạo bào tử và yếm khí không bắt buộc. Nó tạo ra baxitraxin, alpha amylaza, lactamaza, proteaza và phosphataza kiềm tính. Đây là vi sinh vật không gây bệnh kết hợp với thực vật hoặc nguyên liệu thực vật.

Bacillus megaterium (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương hiếu khí. Nó được xem là loại hoại sinh. Nó tạo ra glucoza dehydrogenaza, penixilin amyđaza, beta-amidaza và proteaza trung tính.

Lactobacillus acidophilus (Bioderpac, 2008) thuộc một trong tám loài vi khuẩn axit lactic. Nó là Gram dương, không tạo bào tử và tạo ra axit lactic trong quá trình lên men sử dụng lactoza là nguồn cacbon chính để sinh năng lượng. Nó sinh trưởng khi có

hoặc không có oxy trong môi trường axit (độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5). Nó tạo ra bacterexin gọi là lactacin B, các axit hữu cơ, điaxetyl và hydro peroxit.

Lactobacillus casei (Bioderpac, 2008) ưa nhiệt trung bình, yếm khí không bắt buộc mà là Gram dương và không tạo bào tử. Nó có khả năng thích nghi với nhiệt độ lạnh. Độ pH tối ưu cho sự sinh trưởng của nó là 5,5. Nó lên men galactosa, glucoza, fructoza, manosa, manitol, và axetylglucosamin. Loài này có thể sinh trưởng trong khoảng độ pH và nhiệt độ rộng. Nó tạo ra enzym amylaza. Nó ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh như *H. pylori* bằng cách làm giảm độ pH trong suốt quá trình tạo ra (1) các axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic hoặc axit lactic hoặc (2) hydro peroxit. Vi sinh vật này tiết ra các bacteroxin.

Pseudomonas fluorescens (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn có nhiều lông roi, hiếu khí bắt buộc và nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh trưởng của nó nằm trong khoảng từ 25 đến 35°C. Nó tạo ra lipaza và proteaza bền nhiệt. Nó là sinh vật đối kháng với nhiều chủng nấm trong đất. Nó tạo ra các chất chuyển hóa phụ như kháng sinh, sắt chelat, và xyanua. Nó tạo ra endochitanaza và xenlulaza trong các môi trường có nồng độ glucoza khác nhau.

Trichoderma harzianum (TRICHOSIL) là nấm hoại sinh. Nó có tác dụng kháng sinh và cạnh tranh sinh học và vì lý do đó có các đặc tính kiểm soát sinh học. Nó tạo ra các enzym phân hủy thành tế bào hoặc kết hợp các hoạt tính này. Nó tạo ra glucanaza, kitinaza, lipaza, và proteaza ngoại bào khi nó tương tác với một số nấm mốc gây bệnh, như *Fusarium*.

Rhizobium japonicum (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn cố định đạm. Nó tổng hợp hệ hydrogenaza tham gia vào việc tái sinh hydro để tránh hao hụt hydro trong quá trình cố định đạm.

Azotobacter vinelandii (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn hiếu khí. Nó tạo ra nitrogenaza và có khả năng cố định đạm.

Clostridium pasteurianum (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương, yếm khí bắt buộc. Nó tạo ra feroxin (protein vận chuyển điện tử) có vai trò cho điện tử trực tiếp trong quá trình khử sắt trong protein.

Proteus vulgaris (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương, yếm khí bắt buộc, sinh trưởng ở nhiệt độ gần 23°C. Nó phân giải protein thành axit amin tự do nhờ các enzym mà nó tạo ra.

Streptomyces sp. (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương trong đất. Nó tạo ra nhiều enzym chuyển hóa các chất dinh dưỡng đa dạng. Nó có thể sống sót trong các thay đổi đáng kể về nhiệt độ, độ ẩm và nguồn dinh dưỡng. Các enzym ngoại bào được tạo ra bởi các vi khuẩn này sử dụng kitin và chitosan làm cơ chất ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và ở 60°C. Đây là các điều kiện hình thành trong các giai đoạn bắt đầu và giai đoạn kết thúc của quá trình lên men lactic trong quy trình phân giải sinh học.

Nitrobacter sp. (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, chuyển hóa nitrit thành nitrat. Nó sinh trưởng ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 34°C. Vi khuẩn này phân giải các polyme hữu cơ như kitin thành các hợp chất mà các sinh vật khác sử dụng, như *Pseudomonas fluorescens*() và *Rhizobium japonicum*(Bioderpac2008).

Micrococcus sp. (Bioderpac, 2008) là vi khuẩn Gram dương hình cầu. Vi sinh vật này kết hợp với *Streptomyces* sp () có khả năng phân giải các chất dẫn xuất kitin dạng keo.

Các nhóm và hoạt tính enzym của các vi sinh vật trong HQE

Quá trình phân giải sinh học các thành phần của động vật biển hoặc các sản phẩm phụ cần có các enzym thủy phân như proteaza, lipaza, và kitinaza. Các chế phẩm vi sinh theo sáng chế chứa một hoặc nhiều enzym như vậy.

Nhóm vi sinh vật chính trong HQE là *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008), *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008), *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008) và *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL). Các vi sinh vật này có khả năng phân giải sinh học động vật chân đốt hoặc các sản phẩm phụ của động vật chân đốt. Một hoặc nhiều thành viên của nhóm chính này còn có tác dụng hiệp đồng khi kết hợp với các vi sinh vật khác trong HQE.

Nhóm vi sinh vật thứ nhất bao gồm các vi sinh vật gây giảm độ pH và làm ổn định sự lên men do tạo ra các axit hữu cơ và hydro peroxit. Nhóm này bao gồm *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008) và *Lactobacillus casei* (Biodepac 2008). Hoạt tính của chúng là quan trọng khi bắt đầu lên men và trong các giai đoạn cuối của quá trình lên men để tạo ra độ pH tối ưu cho các enzym gây thủy phân. Hoạt tính của chúng còn tạo ra môi trường giống ngăn ngừa sự sinh trưởng của các vi sinh vật không mong muốn và hỗ trợ quá trình khử khoáng của các phế liệu kitin. *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008) là thành viên của nhóm chính này.

Nhóm vi sinh vật thứ hai bao gồm các vi sinh vật tạo ra các enzym ngoại bào. Nhóm thứ hai này bao gồm *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Biodepac 2008), *Trichoderma harzianum* (Biodepac 2008), *Rhizobium japonicum* (Biodepac 2008) và *Azotobacter vinelandii* (Biodepac 2008). Các mạch kitin trong động vật chân đốt hoặc các sản phẩm phụ của động vật chân đốt được kết hợp với các phân tử protein. Việc tách các polyme này cần bước thủy phân bởi các enzym phân giải kitin và các enzym phân giải protein do các vi sinh vật này tạo ra. Cả hai loại enzym này phá vỡ mạch ở phần bên trong của polyme để tạo ra các oligome có kích thước đa dạng. Tác dụng của các enzym này đạt được theo cách lần lượt trong các pha trung gian và pha cuối của quá trình lên men khi đạt đến các điều kiện thích hợp về độ pH. Các vi sinh vật thuộc nhóm này, và các điều kiện môi trường mà chúng tạo ra, tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng các chất màu và phần mỡ bám vào các phế liệu này. *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS) và *Trichoderma harzianum* (Biodepac 2008) là các thành viên của nhóm chính.

Nhóm vi sinh vật thứ ba bao gồm các vi sinh vật *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008), *Spreptomyces*, (Biodepac 2008) và *Clostridium* (Biodepac 2008). Các vi sinh vật này thủy phân các oligome (các chito-oligosacarit và các peptit) để tạo ra chitobioza, glucosamin, và axit amin tự do. *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008) và *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008) là các thành viên của nhóm chính.

Theo các phương án được ưu tiên, một hoặc hai vi sinh vật thuộc nhóm vi sinh vật thứ nhất, thứ hai và thứ ba có thể được kết hợp. Theo cách khác, tất cả thuộc nhóm thứ nhất, thứ hai và thứ ba có thể được kết hợp.

Nhóm vi sinh vật thứ tư bao gồm *Bacillus thuringiensis* (các chủng HD-1 và/hoặc HD-73), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) và *Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008). Nhóm vi sinh vật thứ tư có thể được kết hợp với (1) nhóm vi sinh vật chính (2) vi sinh vật bất kỳ thuộc nhóm vi sinh vật thứ nhất, thứ hai và thứ ba (3) sự kết hợp một hoặc hai vi sinh vật thuộc nhóm vi sinh vật thứ nhất, thứ hai và thứ ba hoặc (4) sự kết hợp tất cả thuộc nhóm vi sinh vật thứ hai và thứ ba. Việc bổ sung nhóm thứ tư này tạo ra tác dụng hiệp đồng thúc đẩy quy trình phân giải sinh học.

Mỗi nhóm riêng rẽ trong số các nhóm này, kể cả nhóm chính, đều là hữu dụng và có thể được kết hợp với các chế phẩm vi sinh đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để nâng cao tính năng của chúng. Liên quan đến khía cạnh này, nhóm thứ tư là được đặc biệt ưu tiên.

Bảng 2 thể hiện một vài cách kết hợp trong số các cách kết hợp nêu trên. Cột 1 là danh mục gồm các vi sinh vật đã biết trong HQE được tin là có hoạt tính trong quy trình phân giải sinh học. Cột 2 liệt kê các vi sinh vật trong cột 1 nhưng không có các vi sinh vật trong nhóm vi sinh vật thứ tư. Cột 3 thể hiện sự kết hợp các vi sinh vật chính trong khi các cột 4, 5 và 6 thể hiện sự kết hợp các vi sinh vật thuộc nhóm thứ nhất, thứ hai và thứ ba. Cột 4 thể hiện sự kết hợp các nhóm 1 và 2; cột 5 thể hiện sự kết hợp các nhóm 1 và 3 và cột 6 thể hiện sự kết hợp các nhóm 2 và 3. Các cách kết hợp hữu dụng khác được thể hiện trong các cột từ 7 đến 10.

Bảng 2. Thành phần giống

Vi sinh vật	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	x	x	x	x		x	x	x		x
<i>Bacillus cereus</i>	x	x		x		x		x		x
<i>Bacillus megaterium</i>	x	x								
<i>Azotobacter vinelandii</i>	x	x		x		x		x		x
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	
<i>Lactobacillus casei</i>	x	x		x	x			x	x	
<i>Trichoderma harzianum</i>	x	x	x	x		x	x	x		x
<i>Rhizobium japonicum</i>	x	x		x		x		x		x
<i>Clostridium pasteurianum</i>	x	x			x	x			x	x
<i>Bacillus licheniformis</i>	x	x	x		x	x	x		x	x
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	x	x	x		x	x				
<i>Bacillus thuringiensis</i>	x					x	x	x	x	x
<i>Streptomyces</i>	x				x	x	x	x	x	x
<i>Nitrobacter</i>	x						x	x	x	x
<i>Micrococcus</i>	x						x	x	x	x
<i>Proteus vulgaris</i>	x						x	x	x	x

Hoạt tính của các phần chiết enzym được tạo ra bởi các vi sinh vật trong HQE là phức tạp, nhưng cho phép phân giải các phế liệu kitin của các động vật chân đốt như các loài giáp xác. Các vi sinh vật trong HQE được hoạt hóa theo cách lần lượt tùy theo môi trường tạo ra bởi các sinh vật được sử dụng.

Phương pháp nhận dạng và phân lập sinh vật trong HQE

Điều quan trọng là thu được các thể phân lập tinh khiết trước khi xác định đặc tính hoặc nhận dạng một loài. Một vài vi khuẩn có hình thái học đặc biệt và có thể được nhận dạng mà không cần phân lập, nhưng hầu như tất cả vi khuẩn đều cần được phân lập. Dưới đây mô tả việc phân lập giống cấy tinh khiết ra khỏi hỗn hợp gồm loài chứa trong HQE đối với *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (các chủng HD-1 và HD-73), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* (SILoSil® BT), *Streptomyces sp.* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter sp.* (Bioderpac, 2008) và *Micrococcus sp.* (Bioderpac, 2008).

Bước thứ nhất bao gồm:

- (1) Cấy thành vạch dịch pha loãng và ủ phân biệt
- (2) Nhận dạng và phân lập các loại khuẩn lạc
- (3) Thu hẹp bộ sưu tập, và
- (4) Xác định đặc tính ban đầu của các khuẩn lạc đặc hiệu và bảo quản các thể phân lập.

Cấy thành vạch dịch pha loãng và ủ phân biệt

Khi được lấy ra từ mẫu HQE, mẫu nên được cấy ngay lập tức. Mẫu lỏng bất kỳ phải được lắc kỹ trước khi chuẩn bị các đĩa vì các vi khuẩn không có tính di động có thể lắng ở đáy của mẫu nếu chúng được kết hợp với chất dạng hạt. Điều đáng tiếc là vi khuẩn không phân ly một cách đồng nhất và các mẫu lặp lại từ cùng một hỗn hợp có thể chứa lượng vi khuẩn khác nhau. Mục đích của việc lắc kỹ và sau đó cấy thành vạch dịch pha loãng là để dàn riêng từng đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU - Colony Forming Units) sao cho thu được các khuẩn lạc riêng rẽ mà có thể được cấy tiếp.

Tất cả các vi sinh vật nêu trên đều có thể được áp dụng quy trình nhận dạng và phân lập sau, ngoại trừ *Nitrobacter* sp. sẽ được giải thích riêng.

Vòng cấy mẫu HQE đã được lắc kỹ được lấy theo cách vô trùng và được đưa vào một mép của bề mặt aga. Việc cấy thành đường được thực hiện khi di chuyển vào giữa đĩa này bằng cách dịch chuyển vòng này tiến và lùi khoảng một phần tư bề mặt đĩa. Việc cấy thành đường không nên làm vỡ bề mặt aga, và nên có (20 hoặc nhiều) đường cấy vạch được tạo ra. Để làm loãng hoặc dàn mẫu, vòng này phải được hơ trên ngọn lửa để diệt mọi chất liệu sống, chạm vào một chút aga sạch để làm nguội vòng này, sau đó cấy thành các đường vuông góc với giống cấy gốc, trùng lên phần đĩa đó ở một hoặc hai điểm. Phần thứ hai nên bao phủ một nửa bề mặt vô trùng còn lại. Phần này dàn ra một lượng nhỏ giống cấy ban đầu, có thể là làm loãng nó đủ để tạo ra sự xuất hiện của từng khuẩn lạc sau khi ủ. Sau đó, phần thứ ba được cấy thành đường vuông góc với phần thứ hai, hơ trên ngọn lửa và làm nguội vòng này và trùng lên phần trước như nêu trên, để làm loãng tiếp giống cấy.

Để chuẩn bị các thể phân lập từ từng mẻ sản phẩm, pha tiếp theo là chuẩn bị đĩa cấy thành đường lặp lại và ủ chúng trong các điều kiện khác nhau theo vị trí ngược lại, để tối đa hóa cơ hội phân biệt các loại khuẩn lạc đối với *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* (các chủng HD-1 và HD-73, SILoSIL® BT), *Streptomyces* sp. (Bioderpac, 2008), và *Micrococcus* sp. (Bioderpac, 2008). Nhiệt độ ủ thay đổi (thường là 25, 30, và 37°C) và ủ trong cả điều kiện hiếu khí và điều kiện yếm khí. Cách này làm tăng khả năng tách riêng từng loài, vì loài/vi khuẩn khác nhau có khoảng nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng khác nhau và nhu cầu oxy khác nhau. Các sinh vật hiếu khí nên được kiểm tra sau một ngày ủ, vì một số vi khuẩn quan trọng theo sáng chế được thử nghiệm cho thấy sinh trưởng rất nhanh và vượt khỏi các sinh vật khác.

Cách nhận dạng và phân lập các loại khuẩn lạc

Kính hiển vi chia thành mảng với nguồn sáng chuyển có thể được sử dụng để phân biệt từng khuẩn lạc. Các đĩa nên để ngược trong quá trình quan sát. Các khuẩn lạc có thể được phân biệt theo kích thước, hình dáng, độ đục, và kết cấu bề mặt liên quan đến các vi sinh vật nêu trên. Sau khi quan sát xong, tốt nhất là phân biệt các khuẩn lạc được lấy mẫu bằng cách đặt một dấu hiệu nhỏ bên cạnh chúng trên mặt đáy của đĩa. Cần phải lật ngược nắp đĩa để lấy được khuẩn lạc. Cần chú ý đưa vòng vô trùng vào một cách cẩn thận chỉ trong thời gian cần thiết để lấy được giống cây.

Về các đặc tính màu, đặc tính bề mặt và biên dạng (phồng lên, phẳng, v.v.), cần quan sát các khuẩn lạc bằng ánh sáng tới, qua nắp trong. Nắp cần được để nguyên, nếu không thì các đĩa này sẽ bị nhiễm khuẩn. Trước khi lật ngược đĩa, bỏ và mở ngược nắp này để loại bỏ hơi ẩm. Nắp cũ nên được thay bằng nắp mới để quan sát.

Trong trường hợp hai khuẩn lạc trùng lên nhau và vẫn có thể phân biệt được, thì có ít nhất là hai khuẩn lạc. Các khuẩn lạc này thường có kết cấu bề mặt tương đối đơn giản và đồng nhất. Nếu một diện tích giống dạng khảm, thì có thể có ít nhất là hai loài. Từng kiểu khuẩn lạc đặc biệt nên được lấy mẫu bằng cách lấy một ít giống cây và thực hiện ba bước cấy theo đường trên đĩa mới khác. Cần cẩn thận chỉ lấy mẫu khuẩn lạc đáng quan tâm. Ủ từng đĩa mới cấy theo đường trong các điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ mà đĩa ban đầu được ủ.

Các loài sẽ thể hiện nhiệt độ tối ưu, biểu thị bởi mức độ sinh trưởng nhanh hơn và/hoặc các khuẩn lạc to hơn ở nhiệt độ gần nhất với nhiệt độ lý tưởng. Khuẩn lạc bất kỳ mà được lấy mẫu từ đĩa đã được ủ yếm khí sẽ dễ là sinh vật yếm khí không bắt buộc.

Thu hẹp bộ sưu tập

Bản sao cùng loài và chủng để được phân lập từ các đĩa cấy thành đường khác nhau. Nhiều loài khác nhau và nhiều chủng khác nhau của cùng một loài tạo ra các loại khuẩn lạc rất gần giống nhau. Để thu hẹp số lượng thể phân lập đối với các loài/các chủng đặc biệt, cấy lặp lại các thể phân lập nghi ngờ trên cùng một đĩa. Trên hai phần ba bề mặt, thực hiện hai "pha loãng cỡ nhỏ" để thu từng khuẩn lạc cho mỗi giống cây,

và trên một phần ba còn lại thì trộn lẫn chúng. Sau khi ủ, nếu hai thể phân lập sinh trưởng trên cùng một đĩa và/hoặc giống cấy hỗn hợp tạo ra hai loại khuẩn lạc khác nhau, thì xác định được hai thể phân lập đơn nhất.

Xác định đặc tính ban đầu của các khuẩn lạc và bảo quản các thể phân lập

Hầu hết các đặc tính của sinh vật khi xem xét cần phải được xác định bằng cách sử dụng ánh sáng tới, chứ không phải ánh sáng truyền đến.

Sau khi thu được thể phân lập và xác định được sự tinh khiết bằng cả thử nghiệm khuẩn lạc và thử nghiệm dùng kính hiển vi, nên cấy vào ống thạch nghiêng và được ủ ở nhiệt độ thích hợp với nắp đậy không chặt để cho phép trao đổi khí. Sau khi xuất hiện sự sinh trưởng, giống cấy nên xác định định tính chất, nắp được đậy chặt, và ống này được giữ ở nhiệt độ trong phòng làm nguồn giống nguyên chất cho các thử nghiệm.

Ngoài việc xác định tính chất chung, giống mới (<18 giờ) cần được nhuộm theo phương pháp Gram và các kết quả được ghi lại, bao gồm hình dáng và kích thước tế bào, màng bọc hoặc bao nang, nếu thấy rõ, và bằng chứng về bào tử hoặc các cấu trúc tương tự. Mỗi quan hệ với oxy là bước tiếp theo để thu hẹp các hạng mục có thể. Sau đó, chính tổ hợp này, gồm kết quả nhuộm Gram, dạng tế bào, và mối quan hệ với oxy, xác định các loạt bước tiếp theo để xác định tính chất của thể phân lập này.

Phát hiện và đếm quần thể *Nitrobacter* sp. trong sản phẩm

Có một vài thử nghiệm về sự chuyển hóa, sống sót, và sinh trưởng của các sinh vật oxy hóa nitrit trong giống cấy nguyên chất và về hoạt tính nitrit hóa của chúng trong các môi trường khác nhau, nhưng chỉ có ít thử nghiệm về quần thể *Nitrobacter* tự nhiên. Mặc dù quy trình chuyển hóa vi sinh từ nitrit thành nitrat là một quy trình đã biết, các thử nghiệm và quy trình đối với quần thể *Nitrobacter* hiện đang bị vướng bởi phương pháp phát hiện và đếm không thích hợp.

Vướng mắc này một phần là do các đặc tính sinh lý không thuận lợi của các vi khuẩn này, cụ thể là sinh trưởng chậm, sinh khối ít, và giống dễ bị nhiễm khuẩn. Có

cách để đếm quần thể *Nitrobacter* trong đất nhưng tốn thời gian và mang tính chọn lọc.

Mô tả chi tiết quá trình sinh trưởng

Bacillus cereus (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008),
Bacillus subtilis (SILoSil® BS) và *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và aga dinh dưỡng cho môi trường trên đĩa.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại chứa 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga dinh dưỡng, (4) ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 48 giờ, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là khoảng 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Pseudomonas fluorescens và *Proteus vulgaris*

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và aga dinh dưỡng cho môi trường trên đĩa.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga dinh dưỡng, (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 24 đến 48 giờ, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Lactobacillus acidophilus và *Lactobacillus casei*

Aga M.R.S. được phát triển bởi Man, Rogosa và Sharpe để tạo ra môi trường có thể thể hiện sự sinh trưởng tốt của lactobacillus và các vi khuẩn axit lactic khác. Môi trường nuôi cấy này cho phép tất cả các loài lactobacillus phát triển. Peptona và glucoza là nguồn nitơ, cacbon và các yếu tố cần thiết khác cho vi khuẩn sinh trưởng. Sorbitan monoleat, magie, mangan và axetat, là các yếu tố đồng thời và có thể ức chế

sự phát triển của một số vi sinh vật. Amoni xitrat có vai trò làm tác nhân ức chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn Gram âm. Xem Bảng 3.

Bảng 3

Thành phần (gam/lit)		Hướng dẫn
Proteoz pepton N° 3	10,0	Tạo huyền phù 64g môi trường trong một lit nước cất. Để yên nó trong 5 phút, trộn và làm ấm đến nhiệt độ sôi trong khoảng thời gian 1 hoặc 2 phút. Tiệt trùng trong thiết bị tiệt trùng trong thời gian 15 phút đến 121°C.
Chất chiết thịt	8,0	
Chất chiết nấm men	4,0	
Glucoza	20,0	
Sorbitan Monoleat	1ml	
Dikali phosphat	2,0	
Natri axetat	5,0	
Amoni xitrat	2,0	
Magie sulfat	0,2	
Mangan sulfat	0,05	
Aga	13,0	
Độ pH cuối cùng: $6,4 \pm 0,2$		

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và cơ chất aga M.R.S dinh dưỡng cho môi trường trên đĩa.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ trong buồng hiếu khí có từ 5 đến 10% CO₂ loại đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga M.R.S., (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 33 đến 37°C trong 72 giờ hoặc 30°C trong 5 ngày, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Kết quả. Số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Đặc tính của các khuẩn lạc: nhìn chung nhỏ, trắng xám, nhẵn hoặc ráp.

Đặc tính của môi trường: Môi trường điều chế được có màu vàng.

Nhận dạng *Lactobacillus*:

Bảng 4

	Sinh trưởng ở		Axit						NH ₃ Arginin	Sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy chứa 4% NaCl
	15°C	45°C	la	su	sal	mn	so	xi		
<i>L. acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	V	+/-	+/-	+	+	+	-	-	+

Azotobacter vinelandii (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và cơ chất aga dinh dưỡng cho môi trường trên đĩa (Burk's, Asbhy, Jensen's).

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) ủ dung dịch này ở 25°C trong 48 giờ, (3) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (4) ủ hàng loạt đĩa lặp lại, có cơ chất aga dinh dưỡng, với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga dinh dưỡng (5) ủ các đĩa này ở 25°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ, (6) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.0000.000 trong 1ml sản phẩm.

Clostridium pasteurianum (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước đệm phosphat và cơ chất aga theo phương pháp chuẩn cho môi trường trên đĩa (TYG).

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước đệm phosphat, (2) pha loãng theo bậc thích hợp (3) đưa lên đĩa phần phân ước thích hợp cho mức độ pha loãng mong muốn vào các đĩa petri, (4) bổ sung aga theo phương pháp chuẩn đã được làm ôn hòa và trộn trong đĩa, (5) đưa các đĩa khô úp ngược vào buồng yếm khí, (6) ủ các đĩa này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 đến 37°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ, (7) sau giai đoạn ủ, lấy các đĩa ra khỏi buồng yếm khí và đếm các đĩa này, ghi lại mức pha loãng được áp dụng và tổng số khuẩn lạc đếm được cho mỗi mức pha loãng, (8) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Bước nhận dạng loài *Clostridium* này sử dụng hình thái học thông thường trên kính hiển vi của khuẩn lạc cho phép nhận dạng nhanh và đúng một số loài *Clostridium*

thường phân lập được. Ngoài ra, cùng với việc áp dụng các thử nghiệm sinh hóa đơn giản như thử nghiệm tạo ra lexitinaza và lipaza trong lòng đỏ trứng aga, thủy phân gelatin và urê và tạo ra indol thông qua phương pháp nhanh (p-đimetyl-amino-xinamalđehit), là phương pháp nhanh và không tốn kém để nhận dạng, thậm chí xác định, cho một vài trong số đó.

Micrococcus sp. (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và aga dinh dưỡng cho môi trường trên đĩa.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga dinh dưỡng, (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Nếu tìm thấy khuẩn cầu Gram dương, thì thực hiện các thử nghiệm về tính nhạy cảm với kháng sinh. *Micrococcus* là nhạy cảm với Bacitraxin và kháng furazolidon.

Rhizobium japonicum (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và môi trường ALM trong đĩa (aga chứa chất chiết nấm men manitol).

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là ALM (aga chiết xuất nấm men manitol), (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 96 giờ, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Để xác nhận *Rhizobium japonicum*(Bioderpac, 2008), khuẩn lạc phân lập được được sử dụng để gây nhiễm cây họ đậu trong điều kiện vô trùng để tạo ra các nốt sần.

Trichoderma harzianum (TRICHOSIL)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và môi trường chứa cơ chất aga chiết xuất mạch nha (2% trọng lượng/thể tích) có bổ sung cloramphenicol, streptomycin sulfat, và nystatin.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga chiết xuất mạch nha (4) ủ các đĩa này ở 25°C trong 4 ngày, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Bacillus thuringiensis (Các chủng HD-1 và HD-73(SILoSil® BT))

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và đưa vào đĩa chứa môi trường Siêu nuôi cấy chứa cơ chất aga có bổ sung D-glucosa ở nồng độ 2g/lit và erythromycin ở nồng độ 50µg/ml.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga Siêu môi trường nuôi cấy (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 14 ngày, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Streptomyces sp. (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và đưa lên đĩa chứa môi trường chứa aga phân lập khuẩn tia.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa là aga phân lập khuẩn tia (4) ủ các đĩa này ở 28°C trong 2-3 ngày, (5) số đơn vị tạo khuẩn lạc phải là 1.000.000 trong 1ml sản phẩm.

Nitrobacter sp. (Bioderpac, 2008)

Thành phần môi trường: nước tinh khiết và cho vào đĩa chứa cơ chất chứa môi trường aga dinh dưỡng.

Quy trình: (1) đưa 0,1ml mẫu HQE lỏng vào 9,9ml nước tinh khiết, (2) bắt đầu pha loãng theo bậc đến 1-10, (3) ủ hàng loạt đĩa lặp lại với 1ml trong khoảng pha loãng, môi trường trên đĩa chứa cơ chất aga dinh dưỡng trên đĩa, (4) ủ các đĩa này ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 14 ngày.

Quy trình phân giải sinh học

Theo phương án được ưu tiên, động vật chân đốt biển là động vật giáp xác và động vật giáp xác được ưu tiên là tôm. Sản phẩm phụ của tôm bao gồm phần đầu ngực tôm và/hoặc bộ xương ngoài của tôm.

Theo quy trình phân giải sinh học, tốt hơn nếu bước lên men là lên men hiếu khí không bắt buộc. Cũng tốt hơn, nếu bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C. Tốt hơn, nếu độ pH là thấp hơn 6, tốt hơn nữa là thấp hơn 5,5. Tuy nhiên, độ pH nên được duy trì cao hơn 4,3. Bước lên men được thực hiện trong khoảng thời gian từ 24 đến 96 giờ. Theo một số phương án, bước lên men được thực hiện trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng thời gian từ 24 đến 36 giờ. Thời gian lên men này là ngắn hơn rất nhiều so với thời gian của bước lên men đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là khoảng từ 10 đến 15 ngày để đạt được mức độ phân hủy gần như tương đương, mặc dù không có thông tin vào phát hiện được về sự tạo ra chitosan và glucosamin.

Tốt hơn, nếu bước tách hỗn hợp này được thực hiện bằng cách ly tâm (ví dụ, với vận tốc khoảng 920g (9200m/s²)). Cách tách theo trọng lực cũng có thể được áp dụng nhưng không được ưu tiên do cần thời gian để tách.

Hỗn hợp này được tách thành ba phần: rắn, trong nước, và chất béo. Phần rắn chứa kitin và được gọi là HYTc. Phần trong nước chứa sản phẩm thủy phân protein, các axit amin, chitosan và glucosamin và được gọi là HYTb. Phần chất béo chứa sterol, vitamin A và E và các chất màu carotenoid như astaxantin.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm vi sinh nêu trên có thể được sử dụng trong quy trình phân giải sinh học. Theo một số phương án, tốt hơn nếu HQE được sử dụng trong quy trình phân giải sinh học. Theo các phương án khác, tốt hơn nếu HYTb được bổ sung vào HQE hoặc dịch lên men. Như nêu trên, HYTb chứa các axit amin,

chitosan, glucosamin và các nguyên tố vi lượng bao gồm canxi, magie, kẽm, đồng, sắt và mangan. HYTb còn chứa các enzym như các enzym lactic, proteaza, lipaza, kitinaza, axit lactic, polypeptit và hydrat cacbon khác. HYTb còn có thể chứa các vi sinh vật không hoạt động từ quy trình phân giải sinh học trước. Các vi sinh vật này có thể được hoạt hóa lại và, kết hợp với HQE, góp phần đẩy mạnh hơn quy trình phân giải sinh học so với khi HQE được sử dụng riêng lẻ như nêu trên.

Cụ thể hơn, quy trình này bao gồm các bước sau:

- a. Hoạt hóa tế bào vi khuẩn trong dung dịch trên cơ sở đường để tăng mức sinh trưởng của nó và tạo ra sinh khối.
- b. Nghiền các sản phẩm phụ của tôm (phần đầu ngực và bộ xương ngoài) để tạo ra bột nhão đồng nhất.
- c. Trộn đều bột nhão chứa sản phẩm phụ của tôm với ít nhất 10% giống cấy đã được hoạt hóa.
- d. Điều chỉnh độ pH của hỗn hợp này đến trị số thấp hơn 6,0 bằng cách sử dụng dung dịch axit xitric để ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật và để thúc đẩy sự phát triển của các tế bào vi khuẩn cấu thành nên giống cấy.
- e. Lên men hỗn hợp này trong hệ được khuấy không liên tục ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C trong khoảng thời gian ít nhất là 96 giờ, duy trì độ pH ở trị số thấp hơn 5,0. Độ pH được theo dõi định kỳ. Nếu độ pH tăng trên 5,0, thì dung dịch đệm axit xitric được bổ sung vào với lượng đủ để duy trì độ pH dưới 5,0.
- f. Ly tâm dịch lên men để riêng tách ba phần chính: kitin, sản phẩm thủy phân lỏng và bột nhão có màu.
- g. Rửa kitin thô và thu gom nước rửa để thu hồi các chất rắn mịn hoặc các chất khoáng.
- h. Sấy khô kitin và bảo quản.
- i. Sấy khô và bảo quản sản phẩm thủy phân lỏng.
- j. Bột nhão có màu (phần chất béo) được bảo quản trong hộp đựng kín để bảo quản.

Quy trình này và các bước vận hành cơ bản được hiểu rõ hơn có dựa vào hình 1 và phần mô tả chi tiết dưới đây.

Hoạt hóa các tế bào vi khuẩn

Chế phẩm vi sinh được bọc lộn trong bản mô tả này được sử dụng làm giống cấy. Giống cấy chứa HQE có nồng độ vi khuẩn nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,0% (trọng lượng/thể tích). HQE được hoạt hóa bằng cách pha loãng đến 5% trong dung dịch đường mía (nồng độ đường mía cuối cùng là 3,75%), và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 ngày. Tốt hơn, nếu HYTb (10ml trong mỗi lít dịch nuôi cấy) được bổ sung vào để tạo ra nguồn chất khoáng và các axit amin tự nhiên. Mức độ sinh trưởng tế bào của các vi sinh vật được đánh giá theo mật độ quang học đo được ở 540nm. Bước hoạt hóa hoàn thành ở mật độ quang học khoảng 1,7. Nồng độ vi khuẩn sau khi hoạt hóa nằm trong khoảng từ 1,9 đến 3,0% (trọng lượng/thể tích).

Chuẩn bị mẫu

Các mẫu sản phẩm phụ của tôm thu được từ nhà máy chế biến tôm. Phế liệu đã được tráng qua và được xay nhỏ (1500g mỗi mẻ) được trộn với 99 gam đường mía (nồng độ cuối cùng 6,6% trọng lượng) và 85,5ml HQE đã được hoạt hóa 5% (thể tích/trọng lượng) (mật độ quang học tế bào = 1,7). Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến 5,5 bằng cách sử dụng 2M axit xitric.

Kiểm soát bước lên men

Hỗn hợp này được ủ ở 36°C và khuấy không liên tục trong 96 giờ. Trong quá trình lên men, độ pH được theo dõi bằng cách sử dụng thiết bị đo điện thế, và tổng độ axit chuẩn độ được (total titratable acidity - TTA, %) được xác định bằng cách chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến khi đạt độ pH=8,5. TTA được biểu thị ở dạng phần trăm axit lactic.

Các điều kiện tách

Sản phẩm lên men là dịch ủ nhót có màu vàng đậm, do sự có mặt của astaxantin. Dịch ủ này được ly tâm (5°C) với tốc độ 1250 vòng/phút (930g (930m/s²)) trong 15 phút để thu kitin, các sản phẩm thủy phân lipid, và bột nhão màu. Pha bên trên (bột nhão màu) được tách bằng tay. Các sản phẩm thủy phân lipid được tách bằng cách gạn, và phần lắng xuống cấu thành kitin thô được rửa bằng nước cất để tách các chất rắn mịn. Chất lỏng thu được được thu gom và sấy. Kitin thô, các sản phẩm thủy phân

lipit và các chất rắn mịn được sấy ở nhiệt độ 60°C. Tất cả các phần được bảo quản để tránh ánh sáng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng HQE trong ba mẻ lên men có lặp lại như nêu trong các ví dụ sau.

Ví dụ 1

Kiểm soát việc lên men bằng cách đo độ pH và tổng độ axit chuẩn độ được (TTA, %)

Các trị số độ pH và TTA ban đầu trung bình lần lượt là $7,31 \pm 0,10$ và $0,53 \pm 0,09$. Như được thể hiện trên Hình 2, ban đầu độ pH giảm đến 6,5 do bổ sung 2M axit xitric vào. Sau đó, do quá trình phân giải protein và giải phóng amoni, độ pH lại tăng đến $7,11 \pm 0,08$ trong 2 giờ đầu, và tiếp theo, độ pH giảm bớt 28% (đến $5,28 \pm 0,01$) trong 12 giờ lên men. Sau khoảng 24 giờ lên men, độ pH cuối cùng là $4,57 \pm 0,15$. Song song với hiện tượng giảm độ pH, hiện tượng tương tự quan sát được đối với các trị số TTA trung bình. Trong 2 giờ đầu, trị số TTA trung bình là 1%, và tiếp theo các trị số này tăng dần đến trị số trung bình $3,33 \pm 0,23$ sau 24 giờ, như được thể hiện trên Hình 2.

Ví dụ 2

Sản phẩm lên men và thành phần hóa học

Sau quá trình lên men, dịch ủ được ly tâm để tách ba sản phẩm chính (kitin, sản phẩm thủy phân lỏng, và bột nhão màu). Sản phẩm khác, là các chất rắn mịn được giữ trong nước rửa kitin thô. Bảng 5 thể hiện tỷ lệ thu hồi được trong từng phân đoạn. Trong lượng khô, phần nhiều hơn tương ứng với sản phẩm thủy phân lỏng (55%), tiếp theo là các chất rắn mịn (29%), kitin thô (10%) và bột nhão màu (5%). Trong mẻ đã được lên men, trọng lượng khô trung bình là 32% ($481,1 \pm 5,6g$).

Bảng 6 thể hiện đặc tính hóa học của từng sản phẩm trong số bốn sản phẩm chính thu được sau quá trình lên men. Sản phẩm kitin (chitin) thể hiện sự khử khoáng không hoàn toàn được phản ánh là tro. Nó còn cho thấy hàm lượng protein cao (42,34%) định lượng được ở các sản phẩm thủy phân lipit. Điều này tạo điều kiện

thuận lợi cho việc thu hồi bột nhão có màu, chủ yếu chứa toàn bộ chất béo (42,67%), và tạo ra phần chứa nhiều tro (16,72%) trong các chất rắn mịn.

Bảng 5. Các sản phẩm tách được sau bước lên men

<i>Chất khô</i> (g)	<i>Kitin thô</i> (g)	<i>Sản phẩm thủy phân lỏng</i> (g)	<i>Bột nhão lipit</i> (g)	<i>Chất rắn mịn</i> (g)
480,0	48,0	264,4	22,9	141,2
487,5	50,2	268,8	24,0	140,8
475,7	51,0	265,7	23,7	131,7
481,1 ± 5,6	49,5 ± 2,4	266,3 ± 4,6	23,3 ± 0,5	141,9 ± 5,5

Bảng 6. Thành phần hóa học (trọng lượng khô) của các sản phẩm lên men

Sản phẩm	% Protein	% tro	% Tổng chất béo
Kitin thô	18,12 ± 0,15	4,36 ± 0,26	2,02 ± 0,46
Sản phẩm thủy phân lỏng	42,34 ± 0,03	7,96 ± 0,16	4,28 ± 0,28
Bột nhão lipit	30,80 ± 0,25	5,11 ± 0,16	42,67 ± 0,63
Chất rắn mịn	31,62 ± 0,10	16,72 ± 0,37	Không xác định

Ví dụ 3

Hàm lượng axit amin trong các sản phẩm thủy phân dạng bột khô

Hàm lượng axit amin của sản phẩm thủy phân sấy khô được xác định như được mô tả trong ấn phẩm: Lopez-Cervantes et al., “*Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography*”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1105, 1 (2006). Bảng 6 thể hiện tổng hàm lượng axit amin của các sản phẩm thủy phân dạng bột khô. Tỷ lệ giữa các axit amin thiết yếu và các sản phẩm thủy phân dạng bột khô là 52,5%.

Bảng 7. Hàm lượng axit amin trong các sản phẩm thủy phân dạng bột khô
(mg/g trọng lượng khô)

<i>Axit amin</i>	<i>Các sản phẩm thủy phân dạng bột khô</i>
Axit aspartic	38
Axit glutamic	39
Serin	16
Histidina*	9
Glyxin	28
Threonin*	14
Alanin	30
Prolin	8
Tyrosin*	70
Arginin	18
Valin*	20
Metionin*	4
Isoleuxin*	15
Leuxin*	23
Phenylalanin*	39
Lysin*	13
Tổng cộng	394
*Các axit amin thiết yếu	207

Ví dụ 4

Định lượng glucosamin trong kitin thô

Trong kitin, hàm lượng glucosamin được định lượng làm chỉ số về mức độ tinh khiết. Hàm lượng glucosamin trong kitin là 516, 619 và 640mg/g (trọng lượng khô), các trị số này tương ứng với kết quả của ba mẻ lên men đã được thực hiện có lặp lại. Do đó, lượng glucosamin trung bình trong thử nghiệm này là 591mg/g trọng lượng khô kitin. Phương pháp định lượng glucosamin đã được thông báo trong ấn phẩm: Lopez-Cervantes et al., “*Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC*” *Journal of Chromatographic Science*, volume 45, 1 (2007).

Ví dụ 5

Lượng astaxanthin và hàm lượng axit béo trong bột nhão màu

Astaxanthin là chất màu chính trong bột nhão lipid thu được từ phế liệu tôm đã được lên men. Hàm lượng astaxanthin nằm trong khoảng từ 1,98 đến 2,25mg/g⁻¹ bột nhão lipid khô, và trung bình là 2,11mg/g⁻¹ bột nhão lipid khô. Astaxanthin được xác định theo một phiên bản của phương pháp đã được bộc lộ trong ấn phẩm: Lopez-Cervantes et al., “*Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC*” *Biomedical Chromatography*, volume 20, 981 (2006).

Xác định được mười bốn axit béo trong bột nhão có màu. Axit palmitic (C16:0), và axit oleic (C18:1n9) được tìm thấy với lượng nhiều hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vi sinh chứa vi sinh vật có số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-10861.
2. Quy trình phân giải sinh học bao gồm các bước:
trộn động vật biển hoặc sản phẩm phụ của động vật biển với chế phẩm chứa vi sinh vật có số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-10861 để tạo ra hỗn hợp;
lên men hỗn hợp này; và
tách hỗn hợp này thành các phần rắn, phần trong nước, và phần lipid.
3. Quy trình theo điểm 2, trong đó động vật biển nêu trên là động vật chân đốt biển.
4. Quy trình theo điểm 3, trong đó động vật chân đốt biển nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm tôm, cua và loài nhuyễn thể.
5. Quy trình theo điểm 2, trong đó động vật biển nêu trên là cá.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó bước lên men nêu trên là lên men hiếu khí không bắt buộc.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó bước tách nêu trên là bằng ly tâm.
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, trong đó bước lên men nêu trên được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C.
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 8, trong đó bước lên men nêu trên được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,3 đến 5,0.
10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, trong đó bước lên men nêu trên được thực hiện trong khoảng thời gian từ 24 đến 96 giờ.
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 10, trong đó phần trong nước nêu trên chứa các axit amin, chitosan và glucosamin.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó phần trong nước nêu trên còn chứa thêm các nguyên tố vi lượng.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 12, trong đó phần rắn nêu trên chứa kitin.

Fig. 1

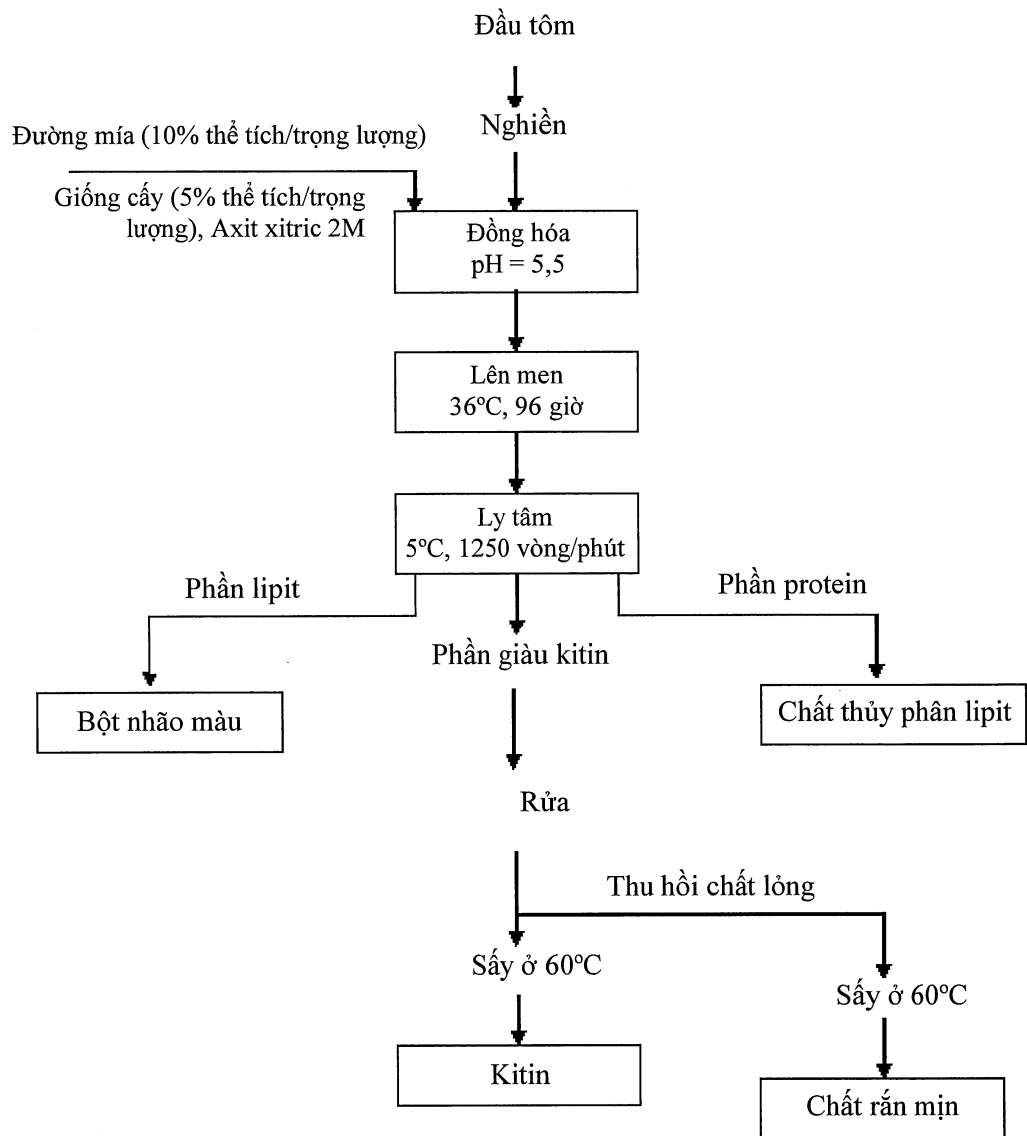


Fig. 2

