BỘ GIÁO DỤC và ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

KHOA CHĂN NUÔI – THÚ Y

****

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

ĐÁNH GIÁ HOẠT LỰC ENZYME PHYTASE, ENZYME XYLANASE TRONG SẢN PHẨM ENZYME THUẦN VÀ TRONG THỨC ĂN HỖN HỢP KHI SỬ DỤNG RIÊNG LẺ HAY KHI PHỐI HỢP CHUNG

Sinh viên thực hiện: NGUYỄN QUANG VINH

Lớp: DH12TY

Ngành: THÚ Y

Niên khóa: 2012-2017

Tháng 08/2017

BỘ GIÁO DỤC và ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
KHOA CHĂN NUÔI – THÚ Y

****

NGUYỄN QUANG VINH

ĐÁNH GIÁ HOẠT LỰC ENZYME PHYTASE, ENZYME XYLANASE TRONG SẢN PHẨM ENZYME THUẦN VÀ TRONG THỨC ĂN HỖN HỢP KHI SỬ DỤNG RIÊNG LẺ HAY KHI PHỐI HỢP CHUNG

Khóa luận được đệ trình để đáp ứng yêu cầu cấp bằng bác sĩ thú y

Giáo viên hướng dẫn
PGS.TS. DƯƠNG DUY ĐỒNG

Tháng 08/2017

XÁC NHẬN CỦA GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN

Họ và Tên sinh viên thực tập: Nguyễn Quang Vinh

Tên khóa luận: **"Đánh giá hoạt lực enzyme phytase, enzyme xylanase trong sản phẩm enzyme thuần và trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ hay khi phối hợp chung".**

Đã hoàn thành khóa luận theo đúng yêu cầu của giáo viên hướng dẫn và các ý kiến nhận xét, đóng góp của hội đồng chấm thi tốt nghiệp Khoa ngày…….

Giáo viên hướng dẫn

PGS. TS. Dương Duy Đồng

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên tôi xin gửi lòng biết ơn sâu sắc đến cha mẹ, người đã nuôi dạy tôi nên người, tạo điều kiện về vật chất cũng như tinh thần để tôi có được như ngày hôm nay.

Trân trọng cảm ơn

Ban giám hiệu trường đại học Nông Lâm TP.HCM.

Ban chủ nhiệm khoa Chăn nuôi Thú y, Bộ môn Dinh dưỡng.

Cùng toàn thể quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong suốt thời gian tôi học tập tại trường.

Chân thành biết ơn

PGS.TS. Dương Duy Đồng đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện đề tài và hoàn thành khóa luận tốt nghiệp này.

Chân thành cảm tạ

Thầy cô Bộ môn Dinh dưỡng cùng toàn thể nhân viên tại Bộ môn đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi thực hiện tốt đề tài này.

Xin cảm ơn

Các bạn trong nhóm đề tài enzyme và những người bạn đã chia sẻ, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Sinh viên

Nguyễn Quang Vinh

TÓM TẮT

Đề tài "**Đánh giá hoạt lực enzyme phytase, enzyme xylanase trong sản phẩm enzyme thuần và trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ hay khi phối hợp chung**" được thực hiện tại phòng thí nghiệm enzyme UAF-SUNHY, Bộ môn Dinh dưỡng Động vật, Khoa Chăn Nuôi - Thú Y, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Thời gian từ tháng 04/2016 đến tháng 01/2017.

Nội dung thí nghiệm: xác định hoạt lực enzyme phytase, enzyme xylanase thuần và trong thức ăn hỗn hợp (trong cùng một công thức thức ăn) khi sử dụng riêng lẻ hay khi phối hợp chung.

Kết quả cho thấy:

Việc sử dụng kết hợp enzyme xylanase và enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp giúp nâng cao giá trị năng lượng từ thức ăn, tốt hơn so với khi sử dụng riêng lẻ. Trong khi đó, hoạt lực enzyme phytase khi kết hợp với enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp là 455 U/kg TAHH, tuy có thấp hơn so với khi sử dụng riêng lẻ là 529 U/kg TAHH nhưng vẫn nằm trong mức chấp nhận được so với hoạt lực mà nhà sản xuất công bố là 500 U/kg TAHH.

Hoạt lực enzyme phytase thuần đo được là 7240 U/g E cao hơn so với hoạt lực nhà sản xuất công bố là 5000 U/g E. Khi trộn enzyme phytase đơn vào thức ăn hỗn hợp thì hoạt lực của enzyme đo được là 530 U/kg TAHH vẫn cao hơn so với hoạt lực trên lý thuyết là 500 U/kg TAHH (với tỷ lệ trộn 100 g E/tấn TAHH).

Hoạt lực enzyme xylanase thuần đo được là 3224 U/g E (hoạt lực nhà sản xuất công bố là 30000 XU/g E). Khi sử dụng phối hợp enxyme xylanase và enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp, hoạt lực enzyme xylanase đo được là 1675 U/kg TAHH tăng 5,37 % so với khi sử dụng riêng lẻ (với tỷ lệ trộn 500 g E/tấn TAHH).

MỤC LỤC

TRANG

Trang tựa i
Xác nhận của giáo viên hướng dẫn ii
Lời cảm ơn iii
Tóm tắt iv
Mục lục v
Danh sách các chữ viết tắt viii
Danh sách các bảng ix
Danh sách các hình xi
Chương 1 MỞ ĐẦU 1
1.1 Đặt vấn đề 1
1.2 Mục đích và yêu cầu 2
1.2.1 Mục đích 2
1.2.2 Yêu cầu 2
Chương 2 3
2.1 Tình hình sử dụng enzyme phytase và enzyme xylanase trong thức ăn chăn nuôi hiện nay 3
2.1.1 Tình hình trên thế giới 3
2.1.2 Tình hình trong nước 3
2.2 Tổng quan về enzyme 4
2.2.1 Khái niệm 4
2.2.2 Đặc điểm 4
2.2.3 Tính đặc hiệu của enzyme 4
2.2.4 Vai trò của enzyme 5
2.2.5 Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme 5
2.3 Giới thiệu sơ lược về Axit phytic và phytate 7
2.4 Tổng quan về phytase 9
2.4.1 Phytase từ thực vật 9

2.4.2 Phytase động vật 9
2.4.3 Phytase từ vi sinh vật 10
2.4.4 Vai trò của phytase trong thức ăn chăn nuôi 10
2.5 Giới thiệu sơ lược về Xylan 11
2.6 Tổng quan về xylanase 13
2.6.1 Vai trò của xylanase trong thức ăn chăn nuôi 13
2.7 Các đơn vị đo hoạt tính enzyme 14
2.8 Một số phương pháp xác định hoạt lực enzyme 15
2.9 Một số lưu ý khi tiến hành thí nghiệm đo hoạt lực enzyme 16
Chương 3 NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 17
3.1 Thời gian và địa điểm 17
3.2 Đối tượng thí nghiệm 17
3.3 Nội dung nghiên cứu 17
3.3.1 Xác định hoạt lực enzyme phytase thuần 18
3.3.2 Xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp 19
3.3.3 Xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần 20
3.3.4 Xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp 21
3.3.5 Xử lý số liệu 22
Chương 4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 23
4.1 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase thuần 23
4.2 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp 24
4.3 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase 25
4.4 Khả năng giải phóng phospho của enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp 26
4.5 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần 28
4.6 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp 29
4.7 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase 30
4.8 Khả năng giải phóng xylose của enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp 31

4.9 Phân tích mẫu enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng 33
4.9.1 Kết quả phân tích hoạt lực mẫu enzyme xylanase thuần được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng 35
4.9.2 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột và dạng ép viên được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng.....36
Chương 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 37
5.1 Kết luận 37
5.2 Đề nghị 37
TÀI LIỆU THAM KHẢO 38
PHỤ LỤC 40

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nguyên văn	Nghĩa tiếng Việt
DCP	Dicalci Phosphate	
MCP	Monocalci Phosphate	
NSP	Non-starch polysaccharides	Đường không phải tinh bột
UIB	International Union of Biochemistry	Hiệp hội Hóa sinh quốc tế
TAHH		Thức ăn hỗn hợp
OD	Optical Density	Độ hấp phụ

DANH SÁCH CÁC BẢNG

TRANG

Bảng 2.1 Độ bền nhiệt của một số sản phẩm enzyme 6
Bảng 2.2 Khoảng pH tối ưu của một số sản phẩm enzyme.....6
Bảng 2.3 Hàm lượng phospho tổng số và phospho phytin trong một số loại thức ăn thực vật.....9
Bảng 2.4 Nguồn gốc một số sản phẩm enzyme phytase 10
Bảng 2.5 Thành phần của hạt ngũ cốc (% trọng lượng).....11
Bảng 2.6 Nguồn gốc một số sản phẩm enzyme xylanase.....13
Bảng 2.7 Hoạt lực của một số sản phẩm enzyme có trên thị trường.....15
Bảng 3.1 Công thức thức ăn hỗn hợp 18
Bảng 4.1 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase thuần 23
Bảng 4.2 Kết quả hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp 24
Bảng 4.3 Kết quả hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase 25
Bảng 4.4 Kết quả phân tích tỷ lệ phospho vô cơ được giải phóng nhờ enzyme 27
Bảng 4.5 Khả năng giải phóng phospho của enzyme phytase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp 27
Bảng 4.6 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần 28
Bảng 4.7 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp.....29
Bảng 4.8 Kết quả hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase 30
Bảng 4.9 Lượng xylan trong một số nguyên liệu thức ăn 31
Bảng 4.10 Khả năng giải phóng xylose nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp 32
Bảng 4.11 So sánh tỷ lệ giải phóng xylose và năng lượng nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp.....32
Bảng 4.12 Công thức thức ăn của mẫu cám A, B, C.....33

Bảng 4.13 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase thuần được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng 35
Bảng 4.14 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng 36

DANH SÁCH CÁC HÌNH

TRANG

Hình 2.1 Cấu tạo của phytate 7
Hình 2.2 Cấu tạo của xylan 11

Chương 1
MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Trong ngành sản xuất thức ăn chăn nuôi việc bổ sung enzyme vào trong khẩu phần được ứng dụng khá rộng rãi, nguyên nhân xuất phát từ chính lợi ích mà enzyme đem lại cho vật nuôi đó là cải thiện khả năng tiêu hóa các chất dinh dưỡng và đồng thời hạn chế tác hại của các chất kháng dinh dưỡng có trong thức ăn. Có rất nhiều loại enzyme ngoại sinh được sử dụng mà phổ biến trong số đó là enzyme phytase và enzyme xylanase. Lợi ích của việc sử dụng enzyme phytase là giúp thú dạ dày đơn phân giải phytate (một dạng muối của axit phytic với kim loại hoặc chất hữu cơ) mà 2/3 phospho trong hạt ngũ cốc tồn tại ở dạng này, từ đó tiết kiệm được một phần phospho vô cơ (dạng DCP hoặc MCP) sử dụng trong khẩu phần. Ngoài ra, tỷ lệ chất xơ trong thức ăn gia súc khá cao mà đặc biệt trong số đó là NSP (non-starch polysaccharides), NSP được xem như là một yếu tố kháng dinh dưỡng. Enzyme xylanase giúp phân giải xylan trong NSP thành đường xylose giúp vật nuôi dễ dàng hấp thu năng lượng. Đó là những lợi ích mà hai enzyme phytase và xylanase mang lại, nhưng để tận dụng những lợi ích này thì việc sử dụng riêng lẻ từng loại enzyme hay kết hợp chúng với nhau trong một khẩu phần thức ăn sẽ đem lại nhiều lợi ích hơn cho vật nuôi.

Xuất phát từ thực tế trên, được sự đồng ý của bộ môn Dinh Dưỡng, khoa Chăn Nuôi – Thú Y, trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh cùng với sự hướng dẫn của PGS. TS. Dương Duy Đồng, chúng tôi tiến hành đề tài **"Đánh giá hoạt lực enzyme phytase, enzyme xylanase trong sản phẩm enzyme thuần và trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ hay khi phối hợp chung".**

1.2 Mục đích và yêu cầu

1.2.1 Mục đích

Hoàn thiện quy trình đánh giá hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp.

Xác định và đánh giá hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme xylanase.

Hoàn thiện quy trình đánh giá hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp.

Xác định và đánh giá hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase.

1.2.2 Yêu cầu

Phân tích hoạt lực của enzyme thuần, enzyme trong thức ăn hỗn hợp, từ đó so sánh và đánh giá hoạt lực của enzyme trước và sau khi trộn vào thức ăn hỗn hợp trong trường hợp sử dụng riêng rẽ và phối hợp chung.

Chương 2
TỔNG QUAN

2.1 Tình hình sử dụng enzyme phytase và enzyme xylanase trong thức ăn chăn nuôi hiện nay

2.1.1 Tình hình trên thế giới

Hơn 20 năm qua, thế giới đã có sự phát triển mạnh mẽ trong nhiều lãnh vực nghiên cứu khoa học và do vậy ngành sản xuất thức ăn chăn nuôi đã từ lâu ứng dụng các hiểu biết về NSP và các enzyme tương ứng bổ sung vào thức ăn, giúp cho sự tiêu hóa thức ăn, nhất là tiêu hóa các NSP tốt hơn nên vừa làm tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn chăn nuôi, vừa giảm thiểu những ảnh hưởng xấu của các NSP có sẵn trong thức ăn tác động trên sức khỏe của vật nuôi (Dương Duy Đồng, 2017).

2.1.2 Tình hình trong nước

Tại Việt Nam, có những nghiên cứu về enzyme phytase và enzyme xylanase được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của việc bổ sung hai loại enzyme này vào trong khẩu phần thức ăn chăn nuôi.

Kết quả thực nghiệm tại Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao khoa học công nghệ Đại Học Nông Lâm TP.HCM trên đàn heo 56 con giai đoạn 20-50kg cho thấy: Heo sử dụng cám có bổ sung Bio-zeemTM (sự kết hợp giữa phytase và xylanase) cho kết quả tăng trọng nổi trội, bình quân 26kg/28 ngày và mức độ hao tổn thức ăn 1.34 kg thức ăn/kg tăng trọng. So sánh với cám không bổ sung Bio-zeem, lượng cám tiết kiệm lên đến 6%. Heo thích ăn và trông khoẻ mạnh hơn. Phân heo không loãng, không tanh (Dương Nguyên Khang, 2015).

Một nghiên cứu (với 2 thí nghiệm) được thực hiện tại Đại Học Nông Lâm TP.HCM sử dụng chế phẩm enzyme xylanase trong thức ăn cho gà thịt lông màu (con giống có nguồn gốc từ Bình Định) trong thời gian 0-84 ngày. Kết quả đạt được là tăng tiêu hóa các dưỡng chất trong thức ăn gà lông màu lên thêm từ 1,30% (đạm thô) đến 8,0% (chất béo) và do đó làm cho giá trị năng lượng trao đổi (ME) của thức ăn tăng thêm gần 5% tương ứng với 147 Kcal (Dương Duy Đồng, 2017).

2.2 Tổng quan về enzyme

2.2.1 Khái niệm

Enzyme là chất xúc tác sinh học, nó cho phép các phản ứng cần thiết của sự sống và sự sinh sản của tế bào diễn ra ở một vận tốc cao và với tính chất đặc thù không tạo ra các sản phẩm phụ như ở các phản ứng thông thường. Enzyme có mặt trong tế bào của mọi sinh vật, không những chỉ xúc tác cho các phản ứng trong cơ thể sống mà còn xúc tác cho các phản ứng ngoài tế bào (in vitro) (Nguyễn Phước Nhuận, 2007).

2.2.2 Đặc điểm

Enzyme không bị phá hủy hoặc biến mất trong quá trình tham gia phản ứng, mà khi phản ứng hoàn thành chúng trở về dạng tự do và sẵn sàng bắt đầu một phản ứng mới.

Enzyme là nhân tố có thể ảnh hưởng đến tốc dộ của phản ứng sinh học nhưng không tham gia phản ứng.

Enzyme là chất xúc tác sinh học trung gian hỗ trợ cho sự biến đổi hóa học của vật chất, gia tăng tốc độ phản ứng lên hàng triệu lần so với các chất xúc tác hóa học (Graham, 1990; trích dẫn bởi Đỗ Hữu Phương, 2003).

2.2.3 Tính đặc hiệu của enzyme

Đa số các enzyme có tính chọn lọc đối tượng tác động một cách rõ rệt, mỗi enzyme chỉ tác động lên một cơ chất, một kiểu phản ứng hoặc một loại phản ứng nghĩa là tác dụng của enzyme có tính đặc hiệu. Hiện tượng này có liên quan đến cấu trúc phân tử và trung tâm hoạt động của enzyme (Graham, 1990; trích dẫn bởi Đỗ Hữu Phương, 2003).

2.2.4 Vai trò của enzyme

Giảm độ nhớt trong đường tiêu hóa

Một số loại NSP (non starch polysaccharides) có thể hòa tan trong nước tạo nên độ nhớt bao phủ các nhung mao ruột nên cũng làm giảm khả năng hấp thu dưỡng chất của ruột. Vì vậy việc sử dụng enzyme tiêu hóa được NSP sẽ vừa làm tăng thêm lượng dưỡng chất do tăng khả năng tiêu hóa của thú vừa giúp giảm bớt các ảnh hưởng xấu của NSP gây ra trong đường tiêu hóa (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006).

Phá vỡ thành tế bào

Trong đường tiêu hóa, enzyme phá vỡ vách tế bào của các mảnh thức ăn. Sau khi vách ngoài bị phá vỡ, các enzyme sẽ giúp phân giải lớp tế bào nội nhũ xung quanh, chúng cắt các cơ chất thành các đơn vị phân tử nhỏ để gia xúc có thể sử dụng được (Huỳnh Thị Kim Thanh, 2013).

Tăng cường thủy phân tinh bột, protein, béo và các dưỡng chất khác

Dưới tác động của enzyme tiêu hóa, các chất như tinh bột, protein và chất béo cuối cùng biến thành các sản phẩm dễ tiêu hóa, thú có thể hấp thu được như glucose, acid amin, acid béo,…(Huỳnh Thị Kim Thanh, 2013).

2.2.5 Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme

Nhiệt độ

Các enzyme có bản chất là protein, thường không bền dưới tác động của nhiệt độ cao (> 60 ^{0}C). Trong nhà máy sản xuất thức ăn chăn nuôi, nhiệt độ ép viên thức ăn thường khá cao (> 80 ^{0}C) sẽ ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme khi được trộn vào thức ăn trong quá trình ép viên.

Tốc độ phản ứng của enzyme chịu ảnh hưởng của nhiệt độ, mỗi enzyme có một nhiệt độ tối ưu (tại nhiệt độ này enzyme có hoạt tính cao nhất). Nhiệt độ tối ưu của enzyme có nguồn gốc thực vật khoảng 50 – 60 ^{0}C, enzyme nguồn gốc động vật khoảng 40 – 50 ^{0}C, enzyme có nguồn gốc vi sinh vật sống ở suối nước nóng có tính chịu nhiệt cao > 80 ^{0}C. Khi chưa đạt đến nhiệt độ tối ưu của enzyme thì sự gia tăng nhiệt độ sẽ làm tăng tốc độ phản ứng enzyme. Tuy nhiên, khi đã qua nhiệt độ tối ưu

của enzyme thì sự gia tăng nhiệt độ sẽ làm giảm tốc độ phản ứng và có thể enzyme bị mất hoàn toàn hoạt tính (www.quangvanhai.net).

Bảng 2.1 Độ bền nhiệt của một số sản phẩm enzyme

Sản phẩm	Độ bền nhiệt độ
Enzyme phytase trong thí nghiệm	95 ^{0}C
Enzyme xylanase trong thí nghiệm	85 ^{0}C
Danisco Xylanase	90 ^{0}C
Nutrase Xyla	85 ^{0}C

Ảnh hưởng của pH

Enzyme chỉ hoạt động trong giới hạn pH thích hợp, thường thì biên độ cho phép rất hẹp. Enzyme bị tác động bởi sự thay đổi của môi trường pH. Giá trị pH thích hợp nhất là điểm mà tại đó enzyme hoạt động mạnh nhất, gọi là pH tối ưu.

Giá trị pH quá cao hay quá thấp thường làm mất hoạt lực của phần lớn các enzyme, pH cũng là yếu tố ổn định cho sự hoạt động của enzyme. Mỗi loại enzyme có một vùng ổn định pH riêng, giá trị pH tối ưu thay đổi theo từng loại enzyme khác nhau (Trần Thị Thanh Huyền, 2008).

Bảng 2.2 Khoảng pH tối ưu của một số sản phẩm enzyme

Sản phẩm	pH tối ưu
Biomin Phytase	1,8 – 5,5
Enzyme xylanase trong thí nghiệm	5,7 – 7,0
SunPhase	2,5 – 5,0
Nutrase Xyla	6,0 – 7,0

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất và nồng độ enzyme

Tốc độ phản ứng của enzyme đa số bị thay đổi bởi nồng độ cơ chất - nhưng chỉ khi nồng độ cơ chất còn tương đối thấp. Khi nồng độ cơ chất tăng thì tốc độ phản ứng trở nên ít phụ thuộc vào nồng độ cơ chất mà tùy thuộc vào số lượng enzyme có mặt (www.blogsinhhoc.com).

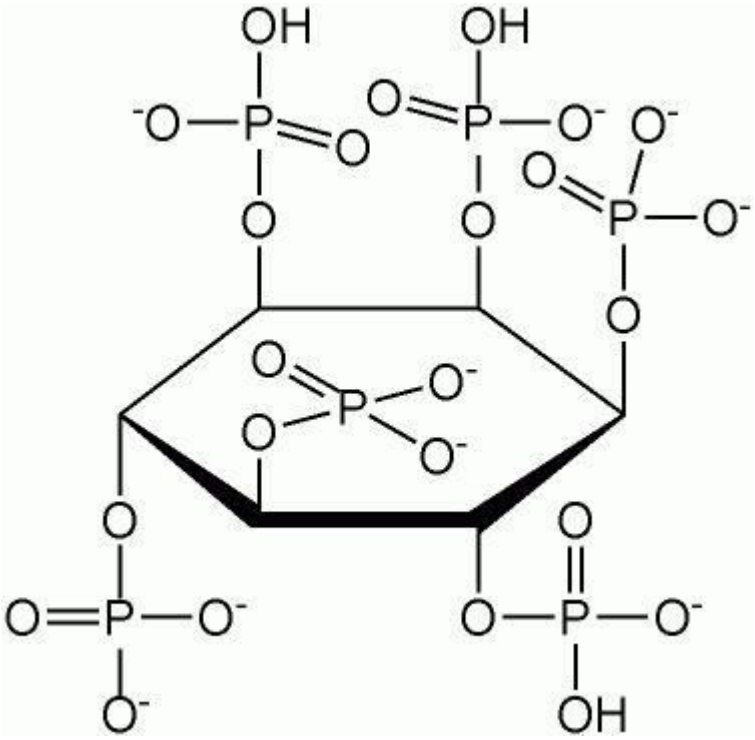
Các nhân tố khác

Trong thức ăn chăn nuôi, có sự tồn tại của một số ion kim loại như: Ca^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, As^{3+}, Pb^{2+}, Hg^{2+},…Các ion kim loại này có thể kìm hãm hay hoạt hóa enzyme. Mức độ hoạt hóa của enzyme chỉ tăng theo nồng độ ion kim loại ở những nồng độ thấp trong một giới hạn xác định, khi vượt qua ngưỡng nồng độ này những ion kim loại lại có tác dụng kìm hãm enzyme (Nguyễn Thị Nhiên, 2012).

2.3 Giới thiệu sơ lược về Axit phytic và phytate

Trong hạt ngũ cốc và hạt cây có dầu như đậu phộng, đậu nành,…có chứa nhiều phospho, nhưng có đến 2/3 lượng phospho ở dạng phytin. Đó là chất inositol-hexaphosphate (axit phytic). Axit này thường liên kết với Ca^{2+}, Mg^{2+} tạo thành dạng khó tan gọi là phytate mà cơ thể thú dạ dày đơn không có men phân giải (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006)

Công thức cấu tạo của phytate.



(Nguồn: https://en.wikipedia.org/wiki/Phytase)

Hình 2.1 Cấu tạo của phytate

Thông thường, phytate ở trong hạt là một hỗn hợp muối kali và magiê của axit phytic nhưng cũng có thể gặp những dạng muối với các kim loại khác như canxi, mangan, kẽm và sắt. Theo Ravindran và ctv (1994), hạt là nơi chứa phytate nhiều nhất nên lượng P phytate trong hạt lên đến 60 - 82 % so với lượng P tổng số tương ứng (Nguyễn Phú Phúc, 2011).

Bảng 2.3 Hàm lượng phospho tổng số và phospho phytin trong một số loại thức ăn thực vật

Các loại thức ăn	Phospho tổng số (%)	Phospho phytin/P tổng số (%)
Lúa mì	0,34	55
Đại mạch	0,39	65
Yến mạch	0,36	53
Bắp	0,36	63
Đậu Hà lan	0,51	49
Cỏ đồng tự nhiên	0,35	37
Cỏ alfalfa	0,20	25

Nguồn: Dương Thanh Liêm và ctv, 2006

2.4 Tổng quan về phytase

Phytase (myo-inositol hexakisphosphate hydrolases) là một nhóm enzyme đặc biệt trong số các enzyme phosphatase, có khả năng xúc tác cho phản ứng thủy phân từng bước axit phytic thành myo-inositol, các nhóm phosphate và các myo-inositol phosphate trung gian (IP_5, IP_4, IP_3, IP_2, IP_1). Phytase là một enzyme có khả năng phá vỡ các liên kết của phức hệ phytate không tiêu hóa được và giải phóng phospho, calci, và các chất dinh dưỡng khác (Nguyễn Thị Triều, 2014).

2.4.1 Phytase từ thực vật

Phytase có nhiều trong các loại ngũ cốc như lúa mì, ngô, lúa mạch, gạo, và từ các loại đậu như đậu nành, đậu trắng…Phytase cũng được tìm thấy trong mù tạt, khoai tây, củ cải, rau diếp, rau bina, và phấn hoa huệ (Nguyễn Thị Triều, 2014).

2.4.2 Phytase động vật

Phytase được tìm thấy trong đường ruột của heo, cừu, bò. Tuy nhiên, phytase trong hệ thống động vật không đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu hóa phytate. Động vật nhai lại tiêu hóa được phytate nhờ hoạt động của phytase được sản xuất bởi hệ vi sinh vật trong dạ cỏ. Lượng phospho vô cơ giải phóng ra nhờ hoạt động

của phytase lên phytate được cả hệ vi sinh vật đường ruột và vật chủ sử dụng (Nguyễn Thị Triều, 2014).

2.4.3 Phytase từ vi sinh vật

Những vi sinh vật sản xuất phytase có từ nhiều nguồn gốc khác nhau như đất, động vật dạ cỏ, nước biển, hạt thực vật. Vi sinh vật sản xuất phytase bao gồm cả những vi khuẩn hiếu khí như *Pseudomonas spp, Bacillus subtilis và Klebsiella spp,* vi khuẩn kị khí như *Escherichia coli* và *Mitsuokella spp,* nấm như *Aspergillus spp* và *Penicillum spp* (Nguyễn Thị Triều, 2014).

Bảng 2.4 Nguồn gốc một số sản phẩm enzyme phytase

Tên sản phẩm	**Nguồn gốc**
Enzyme phytase trong thí nghiệm	Nấm mốc *Aspergillus oryzae*
SunPhase	Vi khuẩn *Escherichia coli*
Biomin Phytase	Vi khuẩn *Escherichia coli*
Axtra PHY	Vi khuẩn *Buttiauxella*

2.4.4 Vai trò của phytase trong thức ăn chăn nuôi

Do sự liên kết chặt chẽ của phytate với các dưỡng chất trong thức ăn (ion kim loại và các hợp chất khác như tinh bột, protein) và thú dạ dày đơn không có enzyme phân hủy phytate nên một lượng lớn phospho có mặt trong phân tử phytate sẽ không được tiêu hóa và thải ra ngoài theo phân. Việc sử dụng enzyme phytase trong thức ăn sẽ giúp phân hủy phytate và giải phóng phospho vô cơ nên có thể tiết kiệm được một phần phospho vô cơ (dưới dạng DCP hoặc MCP) sử dụng trong khẩu phần, từ đó giảm thiểu lượng phospho thải ra ngoài môi trường gây ô nhiễm (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006).

Giải trừ các tác dụng phức tạp của axit phytic trong thức ăn, nâng cao tỉ lệ hấp thu các dưỡng chất như tinh bột, protein, axit amin, và các nguyên tố khoáng như Ca, Zn, Cu, Fe, Mn (Nguyễn Thị Triều, 2014).

Hạ giá thành sản phẩm thông qua việc tận dụng lượng P, Ca, Fe, protein dễ tiêu, giải phóng năng lượng,…giảm việc bổ sung MCP, DCP vào trong khẩu phần thức ăn (Trần Thị Lành, 2014).

2.5 Giới thiệu sơ lược về Xylan

Đa số các nguyên liệu thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc thực vật nên ngoài việc chứa các dưỡng chất có lợi cho vật nuôi thì luôn có kèm theo những thành phần bất lợi cho sức khỏe và/hoặc cho sự tiêu hóa thức ăn của vật nuôi. Phổ biến nhất trong nhóm các thành phần không có lợi này là các chất xơ, hay còn gọi là "các chất bột đường không phải tinh bột" (non-starch polysaccharides - NSP) (Dương Duy Đồng, 2017).

Bảng 2.5 Thành phần của hạt ngũ cốc (% trọng lượng)

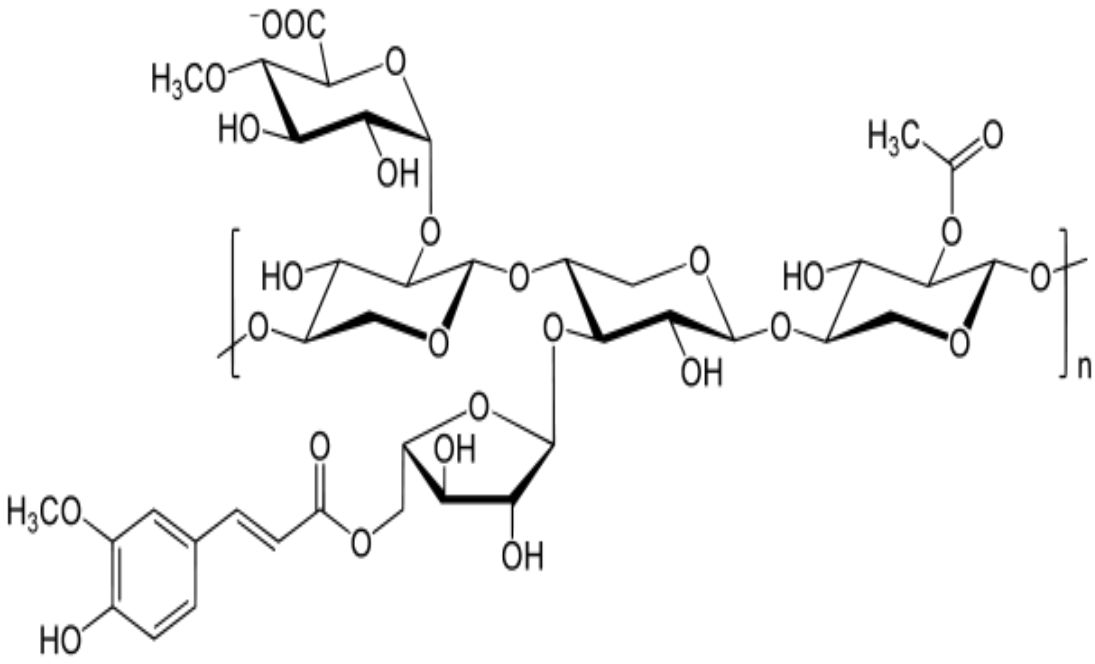
Thành phần các chất	Bắp	Lúa mì	Lúa mạch	Cám gạo	Cám gạo trích béo	Cám mì	Hạt mì
Béo	4	2	2,5	16	2	4	4
Đạm	8	11	11	12	16	15	16
Tinh bột	64	61	56	16 - 23	18 - 25	12 - 20	20 - 40
Thành phần chất xơ							
+ Xơ thô	2,5	2,5	4,0	8	11	11	8
+ Xơ tổng số	8	10	17	27	32	40	29
- Beta-glucan	-	0,7	4,0	-	-	1,8	1,9
-Arabinoxylan	4,5	5,4	6,3	14	16	20	14
- Cellulose	2,4	2,5	3,9	8	9	11	8
+ Lignin	0,5	0,7	2,0	4,5	5,4	6,3	3,5

Nguồn: Finfeeds, 2001; trích dẫn bởi Dương Thanh Liêm và ctv, 2006

NSP gồm một số chất như beta-glucan, arabinoxylan, cellulose, hemicellulose, lignin (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006). Trong đó, xylan là thành phần chính của hemicellulose thực vật, là polysaccharide phổ biến thứ hai trong tự nhiên chỉ sau cellulose và được tìm thấy trong thành tế bào thực vật (Bajpai, 1997; trích dẫn bởi Huỳnh Thị Kim Thanh, 2013).

Xylan là một polysaccharide không đồng nhất, bao gồm các gốc D-xylose liên kết với nhau bằng liên kết β-1,4-xylanosidic (β-1,4- D-xylopyranosyl) giữa đường xylopyranose với acetyl, arabinosyl và glucuronysyl. Thông thường, xylan chiếm khoảng 15 - 30 % trọng lượng chất khô trong cây hạt kín và khoảng 7 – 15 % trọng lượng chất khô của cây hạt trần. Đặc biệt trong cây lá rộng, xylan chiếm tới 35 % tổng trọng lượng chất khô của thực vật (Nguyễn Thị Nhiên, 2012).

Công thức cấu tạo xylan.



(Nguồn: https://vi.wikipedia.org/wiki/Xylan)

Hình 2.2 Cấu tạo của xylan

Do tính không đồng nhất của xylan, sự thủy phân của nó phải cần đến một hệ thống enzyme phức tạp. Enzyme này thường bao gồm hai loại: enzyme không phân nhánh (β-1,4-endoxylanse, ferulic acid esterases) và enzyme phân nhánh (α-arabinofuranosidase, α-glucuronidase, esterase xylan acetyl và esterase axit phenolic). Tất cả các enzyme này tác động tương hỗ để chuyển hóa xylan thành cấu tử đường của nó. Trong đó, endo-β-1,4-xylanase là enzyme quan trọng nhất vì nó

khởi đầu cho quá trình phân giải xylan thành các xylooligosaccharide ngắn (Nguyễn Thị Nhiên, 2012).

Xylose ít ở dạng tự do, thường có mặt trong hợp chất nhầy, chất gôm của thực vật. Xylose có trong thành phần của gỗ, rơm, cám (Đỗ Phước Nhuận, 2007).

2.6 Tổng quan về xylanase

Xylanase cần thiết cho quá trình phân hủy hoàn toàn cơ chất xylan (một polysaccharide không đồng nhất). Xylanase được sinh tổng hợp bởi nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn và động vật nguyên sinh. Trong các loài vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp xylanase, nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn là các nhóm quan trọng nhất, đặc biệt là nấm sợi. Các loại xylanase được sinh ra bởi vi khuẩn và nấm sợi ưa kiềm có khả năng chịu nhiệt tốt hơn và do đó chúng được ứng dụng rộng rãi và cho hiệu quả cao hơn (Nguyễn Thị Nhiên, 2012).

Bảng 2.6 Nguồn gốc một số sản phẩm enzyme xylanase

Tên sản phẩm	**Nguồn gốc**
Enzyme xylanase trong thí nghiệm	Nấm
RONOZYME WX	Nấm mốc *Aspergillus oryzae*
Nutrase xyla	Vi khuẩn *Bacillus Subtilis*

2.6.1 Vai trò của xylanase trong thức ăn chăn nuôi

Do động vật dạ dày đơn không có men phân giải các đường có liên kết beta nên tất cả những NSP trong thức ăn khi vào đường tiêu hóa sẽ không phân hủy thành những đường đơn để được hấp thu nên sẽ được thải ra ngoài theo phân và như vậy gây nên lãng phí một phần năng lượng của phần NSP trong thức ăn không được tiêu hóa. Ngoài ra, do các NSP thường có mạch dài nên trong đường ruột tạo thành mạng lưới bao bọc các dưỡng chất khác như protein, lipid làm giảm sự tiêu hóa các dưỡng chất này (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006).

Việc đưa các enzyme giúp thú tiêu hóa được NSP sẽ vừa làm tăng thêm lượng dưỡng chất (năng lượng, protein thô, acid amin, chất béo) do tăng khả năng

tiêu hóa của thú và vừa giúp giảm bớt các ảnh hưởng xấu của NSP gây ra trong đường tiêu hóa (Dương Thanh Liêm và ctv, 2006).

Xylanase chuyển hóa từng phần arabinoxylan từ cám lúa mì thành arabinoxylan-oligosaccharides. Bên cạnh đặc tính phân cắt để tạo thành Arabinoxylan-oligosaccharides từ cám lúa mì, xylanase trong khẩu phần còn được ghi nhận là có ảnh hưởng tích cực lên tăng trưởng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn ở gà (Kurt Van De Mierop, 2011).

2.7 Các đơn vị đo hoạt tính enzyme

Mục đích xác định hoạt tính enzyme là xác định số đơn vị hoạt tính. Một đơn vị hoạt tính enzyme được định nghĩa theo nhiều phương pháp.

Đơn vị quốc tế

Enzyme unit, viết tắt là U do Hiệp Hội Hóa sinh Quốc Tế (UIB) định nghĩa: Một đơn vị chuẩn của enzyme (1U) là lượng enzyme xúc tác chuyển hóa được 1 µmol cơ chất sau 1 phút ở điều kiện tiêu chuẩn (trích dẫn bởi Nguyễn Thị Triều, 2014).

U = 1 µmol sản phẩm = 1 µmol cơ chất (10^{-6} mol/phút)

Katal

Năm 1979, Hội đồng danh pháp của IUB khuyến cáo nên sử dụng Katal làm đơn vị cơ bản của hoạt tính enzyme. Một Katal là lượng enzyme xúc tác chuyển hóa được 1 mol cơ chất sau 1 giây ở điều kiện tiêu chuẩn.

1 Kat = 1 mol cơ chất/giây = 60 mol/phút = 60 x 10^{-6} µmol/phút = 6 x 10^{-7} U

1 U = 1/60 x 10^{-6} Kat = 16,67 nKat (nanokatal)

Đơn vị Katal được khuyến cáo vì nằm trong hệ đo lường Quốc tế.

Đơn vị tự đặt

Đơn vị hoạt tính dựa vào sự thay đổi đặc tính hỗn hợp phản ứng, ví dụ sự thay đổi độ đục, độ nhớt,…trong một đơn vị thời gian. Trường hợp cơ chất và sản phẩm là một hỗn hợp phức tạp thì áp dụng đơn vị hoạt tính này.

Bảng 2.7 Hoạt lực của một số sản phẩm enzyme có trên thị trường

Tên sản phẩm	Hoạt lực
Enzyme phytase trong thí nghiệm	5000 U/g
Enzyme xylanase trong thí nghiệm	30000 XU/g
Xylanase Sigma	2500 U/g
Econase XT	160000 BXU/g
Nutrase Xyla	9000 U/g

Qua bảng 2.6, ta thấy cùng là sản phẩm enzyme xylanase nhưng do hai nhà sản xuất khác nhau: Nutrase Xyla (enzyme xylanase có hoạt lực là 9000 U/g) và Econase XT (enzyme xylanase có hoạt lực 160000 BXU/g) thì đơn vị đo hoạt tính enzyme cũng khác nhau (U/g khác BXU/g) mà nguyên nhân có thể là do cách định nghĩa hoạt lực enzyme của mỗi công ty là khác nhau.

Công ty Sunhy Biology Co., Ltd định nghĩa về enzyme phytase như sau: một đơn vị enzyme phytase (U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μmol phospho vô cơ mỗi phút từ dung dịch phytate có nồng độ 5 mmol ở điều kiện pH = 5,5 và 37 ^{0}C (Theo định nghĩa của công ty Sunhy Biology Co., Ltd).

2.8 Một số phương pháp xác định hoạt lực enzyme

Nhiều phương pháp phân tích khác nhau được sử dụng: phương pháp đo độ đường khử, đo độ phân cực, áp suất, độ nhớt.

- Phương pháp đo độ đường khử (reducing sugar), chỉ xác định số vết cắt của enzyme lên một cơ chất cụ thể nào đó, mà không chú ý tới vết cắt đó ở đâu. Phương pháp này đã được chứng minh, tương đối chính xác, và được chấp nhận là một phương pháp thường được sử dụng.

- Phương pháp đo độ nhớt (viscosity), cơ bản gần giống như phương pháp trên, nhưng chỉ chú trọng vào những enzyme tạo ra những vết cắt ở giữa của cơ chất. Phương pháp này phản ánh một cách trung thực hơn hoạt tính của enzyme

trong cơ thể con vật, nhưng quá trình thử nghiệm rất tốn thời gian và tương đối phức tạp.

- Phương pháp nhuộm cơ chất (dye substrate), là phương pháp sử dụng các cơ chất đã được nhuộm màu, do vậy khi nó bị enzyme làm rã ra, màu sẽ được giải phóng. Đây là một phương pháp đơn giản, nhưng tương đối mới và chưa được sử dụng rộng rãi trong quá trình phân tích enzyme.

(Dương Thanh Liêm và ctv, 2002).

Phương pháp xác định hoạt tính enzyme phytase của công ty Sunhy Biology Co., Ltd.: "Phytase có thể thủy phân sodium phytate để giải phóng ra orthophosphate và các dẫn xuất inositol, chúng phản ứng với ammoniumvanadate-molybdate tạo thành phức [$(NH_4)_3PO_4NH_4VO_3 16MoO_3$] trong điều kiện axit. Trong phản ứng tạo màu này, mức độ màu tỷ lệ thuận với lượng KH_2PO_4 được thủy phân bơi phytase. Phân tích cường độ màu sắc, từ đó có thể tính được hoạt lực của enzyme phytase" (Theo định nghĩa của công ty Sunhy Biology Co., Ltd).

Ở nhiều công ty sản xuất enzyme thì tự họ đưa ra phương pháp xác định hoạt tính enzyme cho sản phẩm của công ty mình, trong thí nghiệm này chúng tôi áp dụng phương pháp phân tích hoạt tính enzyme phytase của công ty Sunhy Biology Co., Ltd để xác định hoạt tính enzyme phytase.

Việc xác định hoạt lực enzyme xylanase . Do hầu hết các nhà sản xuất đều sử dụng phương pháp đo lượng đường khử nên trong thí nghiệm này chúng tôi cũng áp dụng phương pháp đo lượng đường khử của công ty Sunhy Biology Co., Ltd để xác định hoạt tính enzyme xylanase.

2.9 Một số lưu ý khi tiến hành thí nghiệm đo hoạt lực enzyme

- Cần tránh những yếu tố có thể biến tính enzyme.

- Các thông số nhiệt độ, pH, nồng độ ion và thành phần dung dịch hệ đệm ảnh hưởng lên hoạt tính enzyme. Thử hoạt tính enzyme phải được tiến hành trong điều kiện thích hợp như điều kiện sinh lí, điều kiện tồn trữ thực phẩm hoặc điều kiện mà hoạt lực có thể đạt tối ưu.

- Với những enzyme cần có chất hoạt hóa hoặc chất ổn định phải cho các chất này vào enzyme trước khi cho cơ chất vào hỗn hợp phản ứng.

- Nồng độ cơ chất trong phản ứng enzyme phải ở trong giới hạn thích hợp, đủ thừa để bão hòa enzyme nhưng không quá cao để kìm hãm enzyme. Sau khi dừng phản ứng lượng cơ chất được chuyển hóa 20 – 30 %.

- Thời gian xác định hoạt tính thường từ 5 – 30 phút. Tốt nhất là xác định tốc độ ban đầu của phản ứng (30 – 60 giây), vì giai đoạn này tốc độ phản ứng lớn nhất, sau đó bắt đầu giảm.

(Nguyễn Hoài Hương và Bùi Văn Thế Vinh, 2009).

Chương 3
NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Thời gian và địa điểm

Thí nghiệm được thực hiện từ 04/2016 đến 01/2017 tại phòng thí nghiệm enzyme UAF-SUNHY, Bộ môn Dinh Dưỡng, Khoa Chăn nuôi – Thú y, trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.

3.2 Đối tượng thí nghiệm

Mẫu enzyme phytase được sản xuất từ một công ty sản xuất enzyme ở nước ngoài.

Mẫu enzyme xylanase được sản xuất từ một công ty sản xuất enzyme ở nước ngoài.

3.3 Nội dung nghiên cứu

Đánh giá hoạt lực của enzyme phytase, enzyme xylanase trong sản phẩm thuần và trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng rẽ hoặc phối hợp chung.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng enzyme riêng lẻ hay phối hợp chung khi trộn vào thức ăn hỗn hợp theo đúng tỷ lệ khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Sử dụng enzyme phytase (100 g/tấn TAHH) + thức ăn hỗn hợp.
- Sử dụng enzyme xylanase (500 g/tấn TAHH) + thức ăn hỗn hợp.
- Sử dụng cả hai enzyme phytase (100 g/tấn TAHH) và enzyme xylanase (500 g/tấn TAHH) + thức ăn hỗn hợp.

Cả 3 trường hợp trên đều sử dụng một loại thức ăn hỗn hợp. Chúng tôi tiến hành tự trộn thức ăn hỗn hợp để đảm bảo kiểm soát những thành phần nguyên liệu được trộn vào thức ăn.

Bảng 3.1 Công thức thức ăn hỗn hợp

STT	Nguyên liệu	Liều lượng (%)
1	Bắp vàng	59,41
2	Khoai mì lát	10,44
3	Khô dầu đậu nành 46	27,56
4	Dầu đậu nành	0,21
5	Muối ăn	0,25
6	DCP 18	1,90
7	Cám gạo	0,23
	Tổng	100

3.3.1 Xác định hoạt lực enzyme phytase thuần

Áp dụng theo quy trình phân tích hoạt lực enzyme phytase của công ty Sunhy Biology Co., Ltd.

Nguyên tắc

Phytase có thể thủy phân sodium phytate để giải phóng ra orthophosphate và các dẫn xuất inositol, chúng phản ứng với ammoniumvanadate-molybdate tạo thành phức $[(NH_4)_3PO_4NH_4VO_3.16MoO_3]$ trong điều kiện axit. Trong phản ứng tạo màu này, mức độ màu tỷ lệ thuận với lượng KH_2PO_4 được thủy phân bởi phytase. Phân tích cường độ màu sắc, từ đó có thể tính được hoạt lực của enzyme phytase.

Định nghĩa đơn vị đo hoạt lực enzyme phytase

Một đơn vị enzyme phytase (U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1μmol (Pi) mỗi phút từ dung dịch sodium phytate có nồng độ 5,0 mmol/L ở điều kiện pH = 5,5 và nhiệt độ 37 ^{0}C.

Quy trình xác định hoạt lực enzyme phytase thuần

Quy trình phân tích hoạt lực enzyme phytase thuần được trình bày trong phần phụ lục 1.

Công thức tính hoạt lực enzyme

Lưu ý: Sau khi phân tích xong, chọn những giá trị OD (độ hấp phụ đo được bằng máy quang phổ) nằm trong khoảng từ 0,3 - 0,7 (dựa vào khuyến cáo của công ty Sunhy Biology Co., Ltd) để tính hoạt lực.

$$X\ (U/g) = (Y \times N) / (M \times 30)$$

Trong đó: X (U/g): Hoạt lực của enzyme phytase

Y (mmol/l): Nồng độ phospho vô cơ được tính từ đường chuẩn bằng cách đo độ hấp phụ của dung dịch mẫu

N: Độ pha loãng mẫu enzyme

M (g): Khối lượng mẫu

30 (phút): Thời gian phản ứng

Lưu ý: sai số giữa kết quả 2 lần phân tích, đối với sản phẩm enzyme phytase thuần thì không cao hơn 8 %, đối với sản phẩm thức ăn chăn nuôi có chứa phytase thì không cao hơn 15 %, và kết quả cuối cùng là giá trị trung bình của 2 lần phân tích.

3.3.2 Xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Nguyên tắc xác định hoạt lực enzyme phytase là dựa vào lượng phospho vô cơ được giải phóng từ phospho hữu cơ nhờ enzyme. Nhưng trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme phytase cũng có chứa một lượng phospho vô cơ từ nguyên liệu thức ăn, điều này sẽ làm sai lệch kết quả hoạt lực enzyme trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase. Vì vậy, trước khi trộn enzyme phytase vào thức ăn hỗn hợp, chúng tôi tiến hành đo lượng phospho tổng số và phospho vô cơ có trong thức ăn. Quy trình phân tích phospho vô cơ cũng tương tự như quy trình phân tích phospho tổng số, nhưng không đốt mẫu (xem phụ lục 3). Ngoài ra, để biết được tỷ lệ giải phóng phospho vô cơ từ thức ăn của enzyme phytase, chúng tôi xác định lượng phospho hữu cơ có trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme, bằng cách lấy lượng phospho tổng số trừ đi lượng phospho vô cơ có trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme.

$$P_{\text{tổng số (TAHH chưa trộn enzyme)}} - P_{\text{vô cơ (TAHH chưa trộn enzyme)}} = P_{\text{hữu cơ (TAHH chưa trộn enzyme)}}$$

Sau đó, chúng tôi tiến hành trộn enzyme phytase vào thức ăn hỗn hợp và đo lượng phospho vô cơ do enzyme xúc tác phân giải. Bằng cách lấy lượng phospho vô cơ của thức ăn hỗn hợp đã trộn enzyme phytase trừ đi lượng phospho vô cơ của thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme phytase, ta có được lượng phospho vô cơ do chính enzyme phytase xúc tác phân giải:

$$P_{\text{vô cơ (TAHH đã trộn enzyme)}} - P_{\text{vô cơ (TAHH chưa trộn enzyme)}} = P_{\text{vô cơ (enzyme xúc tác phân giải)}}$$

Từ đó chúng tôi tính được hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp.

Quy trình xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Quy trình phân tích hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp được trình bày trong phần phụ lục 1.

3.3.3 Xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần

Áp dụng theo quy trình phân tích hoạt lực enzyme xylanase của công ty Sunhy Biology Co., Ltd.

Nguyên tắc

Hoạt lực enzyme xylanase được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành do enzyme xylanase thủy phân cơ chất xylan ở nhiệt độ 37 ^{0}C và pH = 5,5. Màu sinh ra được xác định bằng phương pháp so màu trên máy quang phổ ở bước song 540 nm và lượng đường khử tạo ra được xác định từ đường chuẩn xylose đã xây dựng trước.

Định nghĩa đơn vị đo hoạt lực enzyme xylanase

Một đơn vị xylanase (U) được định nghĩa là lượng enzyme cần để giải phóng ra 1μmol đường khử từ dung dịch xylan (5 mg/ml) ở pH = 5,5 và 37 ^{0}C (theo định nghĩa của công ty Wuhan Sunhy Biology Co., Ltd).

Quy trình xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần

Quy trình phân tích hoạt lực enzyme xylanase thuần được trình bày trong phần phụ lục 2.

Công thức tính hoạt lực enzyme xylanase

$$X_D = \frac{[(A_E - A_B)x\ K + C_0}{T\ x\ M}\ x\ 1000$$

Trong đó:

X_D: hoạt lực xylanase trong dung dịch pha loãng (U/ml)

A_E: độ hấp phụ của ống control

A_B: độ hấp phụ của ống sample

K: độ dốc của đường chuẩn

C_0: hệ số chặn của đường chuẩn

M: trọng lượng phân tử của xylose, M ($C_5H_{10}O_5$) = 150,2 g/mol

T: thời gian phản ứng (phút)

1000 là số quy đổi 1 mmol = 1000 µmol

Lưu ý: Giá trị X_D phải nằm trong khoảng 0,04 - 0,1 U/mol. Nếu X_D nằm ngoài khoảng giá trị này, cần phân tích lại với các độ pha loãng khác sao cho phù hợp.

$$X = (X_D\ x\ D_f) / m$$

Trong đó:

X: hoạt lực xylanase trong sản phẩm (U/g hoặc U/ml)

D_f: độ pha loãng

m: khối lượng mẫu phân tích

Lưu ý: sai số giữa kết quả 2 lần phân tích phải nhỏ hơn 8 % và kết quả cuối cùng sẽ là giá trị trung bình của 2 lần phân tích.

3.3.4 Xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Nguyên tắc xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp, là dựa vào lượng đường xylose sau khi phân tích trừ đi lượng đường xylose có sẵn trong thức ăn, từ đó ta có được lượng đường xylose do enzyme xylanase xúc tác phân giải. Nhưng do đa số các loại đường trong nguyên liệu thức ăn ở dạng đường đa, còn xylose là đường đơn, có sẵn trong nguyên liệu thức ăn rất thấp, do đó khó có

thể xác định được. Vì vậy dựa vào công thức thức ăn, chúng tôi tính toán lượng đường xylan có sẵn trong thức ăn để từ đó tính toán tỷ lệ phần trăm khả năng phân giải đường xylan của enzyme xylanase.

Quy trình xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Quy trình phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp được trình bày trong phần phụ lục 2.

3.3.5 Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được lưu trữ bằng phần mềm excel, sau đó dùng phần mềm thống kê Minitab 16 tính toán các tham số thống kê.

Chương 4
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase thuần

Hoạt lực enzyme phytase được nhà sản xuất công bố là 5000 U/g E. Dựa theo hoạt lực công ty công bố và quy trình phân tích, chúng tôi chọn khối lượng mẫu cân để phân tích là 0,4 g.

Độ pha loãng là 25.000 lần để nồng độ enzyme nằm trong khoảng 0,1 – 0,9 U/ml, điều này giúp xác định chính xác hoạt lực enzyme cần phân tích.

Bảng 4.1 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase thuần

STT	Hoạt lực phân tích (U/g E)	Hoạt lực công bố (U/g E)
1	7282	5000
2	7160	
3	7196	
4	7270	
5	7233	
6	7270	
7	7318	
8	7245	
9	7221	
10	7208	
$\overline{X}$ ± SD (U/g E)	7240 ± 46,50	
CV (%)	0,64	

Qua kết quả phân tích cho thấy, hoạt lực trung bình của mẫu enzyme phytase là 7240 U/g E và sự biến động của kết quả phân tích rất thấp (CV = 0,64 %). So với hoạt lực nhà sản xuất công bố là 5000 U/g E thì hoạt lực enzyme phytase phân tích có phần cao hơn. Nguyên nhân có thể là do nhà sản xuất muốn đề phòng trường hợp

trong quá trình tồn trữ làm enzyme giảm dần hoạt lực, cho nên họ thường công bố giá trị hoạt lực enzyme thấp hơn giá trị thực của nó.

4.2 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp được xác định dựa trên lượng phospho vô cơ được giải phóng nhờ xúc tác của enzyme phytase. Phương pháp xác định là lấy lượng phospho vô cơ của thức ăn hỗn hợp (có bổ sung enzyme phytase) trừ đi lượng phospho vô cơ có sẵn trong thức ăn, ta được lượng phospho vô cơ do chính enzyme xúc tác phân giải.

Bảng 4.2 Kết quả hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

STT	Hoạt lực phân tích (U/kg TAHH)	Hoạt lực tính toán(*) (U/kg TAHH)
1	576	724
2	538	
3	496	
4	549	
5	543	
6	538	
7	528	
8	525	
9	513	
10	488	
$\overline{X}$ ± SD (U/kg TAHH)	529 ± 25,84	
CV (%)	4,87	

Chú thích: (*) là hoạt lực enzyme phytase trong TAHH được tính toán dựa trên hoạt lực enzyme phytase thuần đã phân tích.

Theo kết quả phân tích, hoạt lực enzyme phytase thuần là 7240 U/g E sản phẩm, với tỉ lệ trộn là 100 g enzyme/tấn TAHH, suy ra có 724 U/kg TAHH. Tuy nhiên khi phân tích hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp thì kết quả là 529 U/kg TAHH, giảm 26,87 % so với hoạt lực tính toán. Nguyên nhân có thể do

sau khi trộn vào thức ăn, hoạt lực enzyme bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như pH, các kim loại trong thức ăn làm giảm hoạt lực. Nhưng nhìn chung hoạt lực enzyme sau khi trộn vào thức ăn vẫn cao hơn so với hoạt lực được công bố là 500 U/kg TAHH.

4.3 Kết quả xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase

Cách tính hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase cũng tương tự như cách tính hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp.

Bảng 4.3 Kết quả hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase

STT	Hoạt lực phân tích (U/kg TAHH)	Hoạt lực Phytase đơn (U/kg TAHH)
1	465	529
2	452	
3	455	
4	451	
5	470	
6	445	
7	476	
8	447	
9	443	
10	450	
$\overline{X}$ ± SD (U/kg TAHH)	455 ± 11,17	
CV (%)	2,45	

Kết quả phân tích cho thấy, hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase là 455 U/kg TAHH giảm 13,98 % so với hoạt lực enzyme phytase khi sử dụng riêng lẻ. Tuy nhiên, so với hoạt lực enzyme mà nhà sản xuất công bố là 500 U/kg TAHH, thì hoạt lực của enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng kết hợp hai enzyme vẫn nằm trong mức chấp nhận được. Sự giảm hoạt lực enzyme phytase trong trường hợp này chúng tôi ghi nhận và chưa thể khẳng định lý do tại sao lại giảm như vậy. Bước đầu chúng tôi nghi ngờ có thể là do hạn chế của việc trộn thức ăn, khi cân enzyme phytase vì khối lượng enzyme cần cân rất nhỏ dẫn đến enzyme phân bố không đều trong thức ăn làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

4.4 Khả năng giải phóng phospho của enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Lượng phospho tổng số (P_{ts}) đo được trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme: 5,561 ± 0,179 g/kg TAHH ($P_{ts\ trung\ bình}$ ± SD, thí nghiệm được lặp lại 10 lần).

Lượng phospho vô cơ (P_{vc}) đo được trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme: 2,670 ± 0,255 g/kg TAHH ($P_{vc\ trung\ bình}$ ± SD, thí nghiệm được lặp lại 10 lần).

Dựa vào kết quả trên, ta tính được lượng phospho hữu cơ (P_{hc}) trong thức ăn hỗn hợp chưa trộn enzyme: 2,891 ± 0,340 g/kg TAHH ($P_{hc\ trung\ bình}$ ± SD). Tiếp theo, ta đo lượng phospho vô cơ được giải phóng từ thức ăn hỗn nhờ enzyme phytase. Từ đó, ta tính được khả năng tiêu hóa dưỡng chất đối với thức ăn hỗn hợp sử dụng enzyme phytase đơn và thức ăn hỗn hợp sử dụng kết hợp enzyme phytase với enzyme xylanase.

Bảng 4.4 Kết quả phân tích tỷ lệ phospho vô cơ được giải phóng nhờ enzyme

STT	P_{hc} (g/kg TAHH)	P_{vc} được giải phóng nhờ enzyme (g/kg TAHH)		Tỷ lệ P_{vc} được giải phóng(*) (%)	
		Phytase	Phytase và Xylanase	Phytase	Phytase và Xylanase
1	2,680	0,535	0,421	18,679	14.978
2	2,930	0,500	0,423	17,295	14.562
3	3,150	0,461	0,420	15,911	14.632
4	2,970	0,511	0,437	17,641	14.528
5	3,470	0,505	0,414	17,641	15.116
6	2,810	0,500	0,443	17,295	14.320
7	2,810	0,491	0,416	16,949	15.323
8	3,210	0,490	0,412	16,949	14.389
9	2,260	0,495	0,419	16,949	14.251
10	2,620	0,407	0,433	14,182	14.493

Chú thích: (*) Tỷ lệ P_{vc} được giải phóng nhờ enzyme được tính bằng cách lấy lượng P_{vc} được giải phóng chia cho lượng P_{hc} trung bình.

Bảng 4.5 Tỷ lệ giải phóng phospho của enzyme phytase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Mẫu	N (lần)	Phospho giải phóng $\overline{X} \pm SD$ (%)	CV	P
Phytase	10	16,95 ± 1,20	7,07	0,000
Phytase và Xylanse	10	14,66 ± 0,36	2,45	

Kết quả cho thấy, tỷ lệ phospho vô cơ được giải phóng từ P_{hc} nhờ enzyme phytase khi sử dụng đơn là 16,95 %, cao hơn so với lượng phospho được giải phóng từ P_{hc} nhờ enzyme phytase khi sử dụng phối hợp với enzyme xylanase là 14,66 %. Trong trường hợp này chúng tôi chưa thể khẳng định là do nguyên nhân nào mà chỉ nghi ngờ có thể do hạn chế trong quá trình trộn mẫu (khối lượng enzyme được cân rất ít) dẫn đến enzyme phân bố không đều làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

4.5 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần

Bảng 4.6 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase thuần

STT	Hoạt lực phân tích (U/g E)	Hoạt lực công bố (XU/g E)
1	3455	30000
2	3242	
3	3323	
4	3330	
5	3065	
6	3102	
7	3183	
8	3035	
9	3303	
10	3200	
$\overline{X} \pm SD$ (U/g E)	3224 ± 133	
CV (%)	4,12	

Hoạt lực enzyme xylanase thuần phân tích được là 3224 U/g E, giá trị này khác với hoạt lực mà nhà sản xuất công bố là 30000 XU/g E. Nguyên nhân có thể do sự khác nhau về quy trình phân tích dẫn đến đơn vị hoạt lực enzyme khác nhau. Chúng tôi tính toán hoạt lực enzyme xylanase thuần theo đơn vị U/g E và kết quả thu được sẽ là cơ sở để tính toán hoạt lực của enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp khi sử dụng riêng lẻ hay kết hợp với enzyme phytase.

4.6 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Bảng 4.7 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

STT	Hoạt lực phân tích (U/kg TAHH)	Hoạt lực tính toán(*) (U/kg TAHH)
1	1617	1612
2	1591	
3	1556	
4	1542	
5	1584	
6	1647	
7	1520	
8	1577	
9	1623	
10	1593	
$\overline{X}$ ± SD (U/kg TAHH)	1585 ± 38,60	
CV (%)	2,43	

Chú thích: (*) là hoạt lực enzyme xylanase trong TAHH được tính toán dựa trên hoạt lực enzyme xylanase thuần đã phân tích.

Theo kết quả phân tích, hoạt lực enzyme xylanase thuần là 3224 U/g E sản phẩm, với tỉ lệ trộn là 500 g enzyme/tấn thức ăn, suy ra có 1612 U/kg TAHH. Tuy nhiên khi phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp thì kết quả là 1585 U/kg TAHH và sự biến động của kết quả phân tích là rất thấp (CV = 2,43 %). So sánh kết quả thì hoạt lực phân tích đã giảm 1,67 % so với hoạt lực lý thuyết. Nguyên nhân có thể do hạn chế trong quá trình trộn mẫu (khối lượng enzyme được cân rất ít) dẫn đến enzyme phân bố không đều làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Dù vậy, sự chênh lệch này vẫn nằm trong mức chấp nhận được so với tính toán ban đầu.

4.7 Kết quả xác định hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase

Cách tính hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase cũng tương tự như cách tính hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp.

Bảng 4.8 Kết quả hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase

STT	Hoạt lực phân tích (U/kg TAHH)	Hoạt lực Xylanase đơn (U/kg TAHH)
1	1722	1585
2	1630	
3	1623	
4	1667	
5	1670	
6	1670	
7	1724	
8	1739	
9	1667	
10	1639	
$\overline{X}$ ± SD (U/kg TAHH)	1675 ± 40,70	
CV (%)	2,43	

Kết quả phân tích cho thấy, hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase là 1675 U/kg TAHH. So với hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp (1585 U/kg TAHH) thì khi trộn thêm enzyme phytase, hoạt lực enzyme xylanase đã tăng lên 5,37 %. Nguyên nhân có thể là nhờ khả năng phân cắt muối phytate của enzyme phytase giúp giải phóng thêm chất dinh dưỡng, trong đó có thể có một ít đường xylose, nhờ vậy làm tăng lượng xylose được giải phóng.

4.8 Khả năng giải phóng xylose của enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Do lượng đường xylose tự do có sẵn trong các nguyên liệu thức ăn là rất thấp, nên ảnh hưởng không đáng kể đến kết quả phân tích hàm lượng xylose giải phóng được nhờ enzyme xylanase.

Lượng xylan trong thức ăn hỗn hợp được tính toán dựa trên số liệu lý thuyết của một số nguyên liệu chính trong khẩu phần.

Bảng 4.9 Lượng xylan trong nguyên liệu thức ăn

STT	Tên nguyên liệu	Lượng xylan (g/kg nguyên liệu)	Xylan trong TAHH (g/kg)
1	Bắp	53,10	42,74
2	KDĐN 46	40,02	
3	Cám gạo	67,70	

Nguồn: briworldwide.com

Tiếp theo, ta đo lượng xylose được giải phóng từ thức ăn hỗn hợp nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase. Từ đó, ta tính được tỷ lệ xylose được giải phóng nhờ enzyme.

Bảng 4.10 Khả năng giải phóng xylose nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

STT	Xylan (g/kg TAHH)	Xylose được giải phóng nhờ enzyme (g/kg TAHH)		Tỷ lệ Xylose được giải phóng (%)	
		Xylanase	Xylanase và Phytase	Xylanase	Xylanase và Phytase
1	42,74	7,287	7,759	17,050	18,154
2		7,170	7,345	16,776	17,185
3		7,013	7,311	16,409	17,106
4		6,946	7,511	16,252	17,574
5		7,137	7,527	16,699	17,611
6		7,419	7,527	17,358	17,611
7		6,847	7,511	16,020	17,574
8		7,104	7,386	16,621	17,281
9		7,311	7,768	17,106	18,175
10		7,179	7,834	16,797	18,329

Năng lượng của xylose được tính bằng cách lấy lượng xylose do enzyme phân giải nhân với 4,1 Kcal vì 1 g carbohydrate cung cấp khoảng 4,1 Kcal.

Bảng 4.11 So sánh tỷ lệ giải phóng xylose và năng lượng nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Mẫu	N (lần)	Xylose giải phóng $\overline{X} \pm SD$ (%)	Năng lượng $\overline{X} \pm SD$ (Kcal/kg TAHH)	CV (%)	P
Xylanase	10	16,71 ± 0,41	29,280 ± 0,713	2,43	0,000
Xylanase và Phytase	10	17,66 ± 0,43	30,946 ± 0,751	2,43	

Kết quả cho thấy, tỷ lệ giải phóng xylose và năng lượng nhờ enzyme xylanase khi kết hợp với enzyme phytase lần lượt là 17,66 % và 30,946 Kcal/kg TAHH, khác biệt không đáng kể so với tỷ lệ giải phóng xylose và năng lượng nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ lần lượt là 16,71 % và 29,280 Kcal/kg TAHH, tuy nhiên sự khác biệt này lại rất có ý nghĩa về mặt thống kê với $P < 0,001$. Nguyên nhân có thể do khả năng phân cắt muối phytate nhờ enzyme phytase giúp giải phóng thêm chất dinh dưỡng, trong đó có thể có một ít đường xylose, nhờ vậy làm tăng lượng xylose được giải phóng đồng thời cũng làm tăng giá trị năng lượng.

4.9 Phân tích mẫu enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi có tiến hành phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột và dạng ép viên được công ty sản xuất thức ăn X cung cấp. Bao gồm 3 mẫu thức ăn dạng bột là A, B, C tương ứng với 3 mẫu thức ăn dạng ép viên là A_1, B_1, C_1. Trong đó, enzyme xylanase được trộn với tỷ lệ 300 g/tấn thức ăn.

Bảng 4.12 Công thức thức ăn của mẫu cám A, B, C

STT	Nguyên liệu (kg)	A	B	C
1	Khô dầu đậu nành 46 %	255	255	255
2	Bắp vàng	179	179	179
3	Lúa mì	150	150	150
4	Tấm gạo	150	150	150
5	Cám mì 1	50	50	50
6	Mỡ cá basa loại 1	40	40	40
7	Whey permeat	40	40	40
8	Lactose	30	30	30
9	Bột huyết	20	20	20
10	Đường	20	20	20
11	Bột cá 60 %	20	20	20
12	Bột xương thịt 50 %	10	10	10

13	DCP	11	11	11
14	Muối	2,5	2,5	2,5
15	Sodiumbicarbonate	4	4	4
16	Lysine HCL – 98 %	4	4	4
17	Kẽm oxide	2,5	2,5	2,5
18	Methionine - 99 %	2	2	2
19	Threonine - 98	2	2	2
20	Khoáng premix 111	1,5	1,5	1,5
21	Vitamin premix	1	1	1
22	Chống mốc	0,75	0,75	0,75
23	Chống oxi hóa	0,2	0,2	0,2
24	Kitasamycine 10 %	2	-	-
25	Colistin 10 %	1,2	-	-
26	Bioplus	0,5	0,5	0,5
27	Lipidol	0,5	0,5	0,5
28	Xylanase	0,3	0,3	0,3
29	Biotronic top 3	-	1	1
30	Biotronic SE	-	-	3
31	Biotronic P	-	3	-
32	Cinergy	0,25	0,25	-
33	Digestarom	-	-	0,15

Ngoài ra, chúng tôi còn được cung cấp mẫu enzyme xylanase thuần mà công ty đã sử dụng cho các mẫu thức ăn trên, từ đó chúng tôi tiến hành phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong sản phẩm thuần, trong thức ăn hỗn hợp dạng bột và dạng ép viên.

4.9.1 Kết quả phân tích hoạt lực mẫu enzyme xylanase thuần được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Bảng 4.13 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase thuần được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

STT	Hoạt lực phân tích (U/g E)	Hoạt lực công bố (U/g E)
1	13400	8000
2	14200	
3	15000	
4	14800	
5	13960	
6	14200	
7	13000	
8	13600	
9	13600	
10	13800	
$\overline{X}$ ± SD (U/g E)	13956 ± 617	
CV (%)	4,42	

Hoạt lực enzyme xylanase thuần chúng tôi phân tích được là 13956 U/g E, kết quả này cao hơn so với hoạt lực mà nhà sản xuất công bố. Nguyên nhân có thể là do nhà sản xuất đề phòng trường hợp trong quá trình tồn trữ, quá trình trộn và ép viên thức ăn sẽ làm enzyme giảm dần hoạt lực. Vì vậy mà nhà sản xuất thường công bố giá trị hoạt lực enzyme thấp hơn giá trị thực của nó.

4.9.2 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột và dạng ép viên được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Với tỷ lệ trộn là 300 g/tấn thức ăn và dựa trên hoạt lực enzyme xylanase thuần đã phân tích, ta tính toán được hoạt lực enzyme trong TAHH là 4186,80 U/kg TAHH.

Bảng 4.14 Kết quả phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Tên mẫu	N (lần)	Cám dạng bột		Cám dạng viên		P
		Hoạt lực $\overline{X} \pm SD$ (U/kg TAHH)	CV (%)	Hoạt lực $\overline{X} \pm SD$ (U/kg TAHH)	CV (%)	
A (A_1)	10	3822 ± 183,40	4,80	3156 ± 283,10	8,97	0,000
B (B_1)	10	4134 ± 465	11,25	3312 ± 157	4,74	0,000
C (C_1)	10	4041 ± 234	5,83	3390 ± 198,50	5,86	0,000

Kết quả cho thấy, hoạt lực enzyme xylanase ở 3 mẫu thức ăn dạng ép viên A_1, B_1, C_1 đều giảm so với 3 mẫu thức ăn dạng bột tương ứng A, B, C lần lượt là 17,03; 19,88 và 16,11 %; sự khác biệt này rất có ý nghĩa về mặt thống kê với $P < 0,001$. Nguyên nhân có thể do enzyme xylanase trong thức ăn dạng bột sau khi trải qua quá trình ép viên ít nhiều sẽ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ của máy ép. Vì vậy mà hoạt lực enzyme xylanase trong 3 mẫu thức ăn dạng ép viên đều thấp hơn so với 3 mẫu thức ăn dạng bột.

Chương 5
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận

Việc phối hợp hai enzyme phytase và xylanase trong thức ăn hỗn hợp giúp làm tăng lượng xylose được giải phóng, qua đó nâng cao giá trị năng lượng của thức ăn tốt hơn so với khi sử dụng riêng lẻ.

Tỷ lệ giải phóng phospho vô cơ từ thức ăn hỗn hợp khi sử dụng enzyme phytase riêng lẻ cao hơn so với khi kết hợp với enzyme xylanase.

Thức ăn dạng ép viên sau khi trải qua quá trình xử lý nhiệt ít nhiều gây ảnh hưởng đến hoạt lực của enzyme.

5.2 Đề nghị

Dựa vào kết quả thí nghiệm, chúng tôi có một số đề nghị như sau:

Để làm tăng giá trị năng lượng của thức ăn nên sử dụng kết hợp enzyme phytase và enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp.

Để làm tăng lượng phospho vô cơ trong thức ăn nên sử dụng riêng lẻ enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hoài Hương, Bùi Văn Thế Vinh, 2009. *Bài giảng thực thành hóa sinh.* Trường Đại học Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh.

2. Trần Thị Thanh Huyền, 2008. *Khảo sát ảnh hưởng việc sử dụng chế phẩm enzyme tiêu hóa trong chăn nuôi heo thịt*. Luận văn Thạc sĩ Thú y, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ chí Minh.

3. Dương Thanh Liêm, Bùi Huy Như Phúc, Dương Duy Đồng, 2006. *Thức ăn và dinh dưỡng động vật.* Nhà xuất bản Nông nghiệp.

4. Đỗ Hữu Phương, 2003. *Ảnh hưởng của việc bổ sung men porzyme 9302 vào các khẩu phần có tỷ lệ cám gạo khác nhau đến năng suất heo thịt.* Luận văn Thạc sĩ Chăn nuôi, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ chí Minh.

5. Nguyễn Phước Nhuận, Phan Thế Đồng, Lê Thị Phương Hồng, Đỗ Hiếu Liêm, Đinh Thị Ngọc Loan, 2007. *Giáo trình Sinh Hóa học – phần 1.* Nhà xuất bản Nông nghiệp.

6. Nguyễn Thị Nhiên, 2012. *Lựa chọn các điều kiện lên men xốp tối ưu và nghiên cứu đặc tính xylanase từ vi khuẩn ưa nhiệt.* Luận văn Thạc sĩ khoa học, Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc Gia Hà Nội**.**

7. Nguyễn Phú Phúc, 2011. *Ảnh hưởng của Phytase trong thức ăn trên năng suất, phẩm chất trứng và hiệu quả sử dụng dưỡng chất của Gà đẻ thương* phẩm. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Chăn nuôi, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ chí Minh.

8. Nguyễn Thị Triều, 2014. *Ảnh hưởng của nhiệt độ trên hoạt lực enzyme phytase trong sản phẩm thuần và trong thức ăn hỗn hợp.* Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Chăn nuôi, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ chí Minh.

9. Huỳnh Thị Kim Thanh, 2013. *Hoàn thiện quy trình đánh giá hoạt lực enzyme xylanase, xác định hoạt lực enzyme xylanase tinh chất và khi có tác động của các mức nhiệt độ, pH.* Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Chăn nuôi, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ chí Minh.

Tài liệu từ internet

10. “ Phytic acid”. <URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Phytic_acid>

11. “Xylan”. <URL:https://vi.wikipedia.org/wiki/Xylan>

12. “ Enzim và vai trò của enzim trong quá trình chuyển hóa vật chất”. <URL:http://quangvanhai.net/2014/11/enzim-va-vai-tro-cua-enzim.html>

13. “ Các nhân tố ảnh hưởng đến hoạt tính enzim”. <URL: http://www.blogsinhhoc.com/2013/01/297-te-bao.html>

14. Dương Duy Đồng, 2017, “ Enzyme xylanase giúp tang giá trị thức ăn và năng suất gà thịt lông màu”. <URL:http://channuoivietnam.com/enzyme-xylanase-giup-tang-gia-tri-thuc-va-nang-suat-ga-thit-long-mau/>

15. Kurt Van de Mierop, Ronny Mombaerts, Anne Goderis, Greg Mathis, Amy Batal, 2012. “ Comparison of nutrient upgrading of corn based diets in broilers by 3 different commercial NSP-enzyme products”. <URL:http://www.allaboutfeed.net/Feed-Additives/Articles/2012/11/NSP-enzymes-play-positive-role-in-prebiotic-formation-1494155W/>

16. “ Improving nsp digestibility with feed enzymes”. <URL:http://briworldwide.com/improving-nsp-digestibility-with-feed-enzymes/>

17. Dương Nguyên Khang, 2015, “ Cám có hệ men tiêu hóa Bio-zeem – Đột phá trong công nghệ chăn nuôi”. <URL: https://www.conco.com.vn/tin-tuc-su-kien/san-pham-moi/cam-co-he-men-tieu-hoa-bio-zeem-dot-pha-trong-cong-nghe-chan-nuoi/>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Quy trình xác định hoạt lực enzyme phytase trong sản phẩm thuần và trong thức ăn hỗn hợp

I - Thiết bị, dụng cụ thí nghiệm và hóa chất cần thiết

1. Hóa chất

- Ammonium metavanadate (NH_4VO_3, Trung Quốc).
- Hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate $(NH_4)_6MO_{24}.4H_2O$ (Trung Quốc).
- Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa, Trung Quốc).
- Sodium phytate ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$, Trung Quốc).
- Albumin, Fraction V (Trung Quốc).
- Triton X-100 ($C_{34}H_{62}O_{11}$, Trung Quốc). Triton X-100 là chất hoạt động bề mặt không ion.
- Acid nitric 65 % (Đức).
- Ammonia solution (Trung Quốc).
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4, Trung Quốc).
- Acid acetic (Trung Quốc).

2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

- Water bath được cài đặt nhiệt độ 37°C.
- Micro pipet loại 10 - 200 µl, 100 - 1000 µl, 1 - 5 ml.
- Máy quang phổ T6 New Century (UV/VIS) nguồn gốc Trung Quốc được cài đặt bước sóng 415 nm.
- Máy đo pH được hiệu chỉnh 2 ngày 1 lần, đầu dò được bảo quản bằng dung dịch bảo quản điện cực.
- Cân điện tử có độ chính xác là 0,1 mg.
- Máy li tâm.
- Máy lắc ổn nhiệt.
- Máy khuấy từ.
- Vortex.
- Đồng hồ bấm giờ.

- Các dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm như: ống nghiệm, bình định mức 100 ml và 50 ml, beaker, bình tam giác,…

3. Chuẩn bị các dung dịch

a) **Dung dịch buffer 1 (0,25 mol/l, pH 5,5)**

Cân 10,26 g anhydrous sodium acetate hòa tan với 450 ml nước cất 2 lần, chuẩn về pH = 5,5 ± 0,01 bằng axit acetic. Sau khi chuẩn độ thêm nước cất 2 lần vào dung dịch cho đủ 500 ml. Thời hạn sử dụng là 15 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng.

b) Dung dịch buffer 2 (0,25 mol/l, pH 5,5)

Cân 10,26 g anhydrous sodium acetate cho vào beaker 500ml, sau đó tiếp tục cho vào 0,5 g triton X-100 và 0,25 g albumin. Thêm nước cất 2 lần vào tới vạch 450 ml, sau đó chuẩn về pH = 5,5 ± 0,01 bằng axit acetic. Sau khi chuẩn độ xong thêm nước cất 2 lần vào cho đủ 500 ml. Thời hạn sử dụng là 15 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng.

c) Dung dịch sodium phytate (7,5 mmol/l, pH 5,5)

Lấy 0,69 g sodium phytate và 2,052 g anhydrous sodium acetate cho vào cốc thủy tinh rồi hòa tan với 90 ml nước cất 2 lần sau đó chuẩn về pH = 5,5 ± 0,01 bằng axit acetic. Sau khi chuẩn độ xong thêm nước cất 2 lần cho đủ 100 ml.

d) Dung dịch Phosphorus (KH_2PO_4 50 mmol/l)

Potassium dihydrogen phosphat trước khi sử dụng phải đem sấy ở 105 °C trong vòng 4 giờ sau đó cho vào bình hút ẩm để nguội.

Cân 0,6804 g potassium dihydrogen phosphat đã chuẩn bị ở trên sau đó thêm dung dịch buffer 1 vào cho đủ 100 ml.

e) Dung dịch molybdate vanadate (stop reagent)

Cân 0,3525 g ammonium metavanadate cho thêm vào 20 ml nước cất 2 lần khuấy cho dung dịch hòa tan bằng máy khuấy từ. Sau khi dung dịch hòa tan hoàn toàn, cho vào 101 ml acid nitric 65 % và tiếp tục khuấy đều (dung dịch A).

Cân 15 g hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate, sau đó cho vào 1,5 ml dung dịch NH_3 và cho thêm vào 20 ml nước cất 2 lần. Khuấy cho dung dịch hòa tan bằng máy khuấy từ (dung dịch B).

Đổ dung dịch A vào 1 bình chứa màu nâu sau đó đổ tiếp dung dịch B vào rồi thêm nước cất 2 lần cho đủ 600 ml. Bảo quản dung dịch stop reagent ở nhiệt độ phòng trong nơi tối tránh ánh sáng, thời gian sử dụng là 2 tháng.

II – Các bước xác định hoạt lực enzyme phytase thuần

1. Chuẩn bị mẫu

Cân mẫu enzyme có khối lượng từ 0,3 – 0,4 g sau đó cho vào bình tam giác, cho thêm vào 100 ml dung dịch buffer 2 rồi cho vào máy lắc ổn nhiệt điều chỉnh nhiệt độ máy sao cho nhỏ hơn 30 °C, tốc độ lắc là 100 vòng/phút, thời gian lắc 30 phút. Sau đó lấy phần chất lỏng phía trên tiếp tục pha loãng bằng dung dịch buffer 2 sao cho nồng độ enzyme nằm trong khoảng 0,1 – 0,9 U/ml.

Hoạt lực của Phytase (U/g)	Khối lượng mẫu (g)
≥ 5.000	0,1 - 1
1.000 - 5.000	0,2 - 1
500 - 1.000	1 - 2
1 - 500	2 - 5
0,13 - 1	5 - 10

2. Phân tích mẫu

- Mở water bath và cài đặt nhiệt độ ở 37 °C. Ngâm dung dịch sodium phytate vào water bath.
- Chuẩn bị 4 ống nghiệm (C1, C2, S1, S2), cho lần lượt vào các ống nghiệm 0,2 ml dung dịch mẫu enzyme đã chuẩn bị ở trên cùng với 1,8 ml dung dịch buffer 1, đem vortex rồi cho vào water bath đợi 3 – 5 phút.
- Ống S1 và S2: cho vào 4 ml dung dịch sodium phytate. Ống C1 và C2: cho vào 4 ml dung dịch stop reagent.

- 30 phút sau, ống S1 và S2 cho vào 4 ml dung dịch stop reagent. Ống C1 và C2 cho vào 4 ml dung dịch sodium phytate.

- Đợi 10 phút sau lấy ra li tâm 10 phút, tốc độ li tâm là 3800 vòng/phút.

- Đo độ hấp phụ bằng máy quang phổ với bước sóng 415 nm.

Lưu ý: Sau khi phân tích xong, chọn những giá trị OD (độ hấp phụ đo được bằng máy quang phổ) nằm trong khoảng từ 0,3 - 0,7 (dựa vào khuyến cáo của công ty SunHy) để tính hoạt lực.

III – Quy trình xác định hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

- Xác định hoạt lực enzyme được nhà sản xuất công bố và liều lượng sử dụng (g/tấn thức ăn).

- Xay nhuyễn mẫu thức ăn.

❖ Liều lượng sử dụng dùng cho trường hợp mẫu thức ăn có chứa enzyme phytase 5000 U/g, 100 g/tấn thức ăn (độ pha loãng là 5 lần).

- Mở water bath và cài đặt nhiệt độ ở 37 °C.

- Làm ống mẫu:

+ Cân 1 g mẫu thức ăn cho vào bình tam giác 100 ml sau đó cho vào 5 ml dung dịch buffer 2.

+ Lắc mẫu bằng máy lắc ổn nhiệt với tốc độ 100 vòng/phút, trong 30 phút.

+ Dùng khăn mỏng lọc lấy dung dịch.

+ Hút 0,2 ml dung dịch vừa lọc cho vào ống nghiệm rồi thêm 1,8 ml dd Buffer 1. Vortex rồi ủ 5 phút ở 37 °C. Sau đó, lấy ra đem vortex lần nữa rồi ủ thêm 30 phút.

+ Hút 4 ml dd Stop reagent cho vào ống nghiệm. Đem vortex. Tiếp tục ủ thêm 10 phút.

+ Sau khi ủ đem ống nghiệm ly tâm ở tốc độ 3800 vòng/phút trong 10 phút.

+ Đo độ hấp phụ bằng máy quang phổ với bước sóng 415 nm.

- Làm ống Control:

+ Cân 1 g mẫu thức ăn cho vào bình tam giác 100 ml

+ Sau đó cho 5 ml dung dịch buffer 2 vào bình, lắc đều nhanh tay rồi dùng khăn mỏng lọc lấy dung dịch.

+ Hút 0,2 ml dung dịch vừa lọc cho vào ống nghiệm rồi thêm 1,8 ml dd Buffer 1. Đem đi vortex. Hút 4 ml dd Stop Reagent cho vào ống nghiệm. Đem vortex.

+ Ủ 5 phút ở 37 °C. Vortex lần nữa rồi ủ thêm 30 phút. Sau 30 phút đem vortex. Tiếp tục ủ thêm 10 phút.

+ Sau khi ủ đem ống nghiệm ly tâm ở tốc độ 3800 vòng/ phút trong 10 phút.

+ Đo độ hấp phụ bằng máy quang phổ với bước sóng 415 nm.

Lưu ý: Sau khi phân tích xong, chọn những giá trị OD (độ hấp phụ đo được bằng máy quang phổ) nằm trong khoảng từ 0,3 - 0,7 (dựa vào khuyến cáo của công ty SunHy) để tính hoạt lực.

Phụ lục 2. Quy trình xác định hoạt lực enzyme xylanase trong sản phẩm thuần và trong thức ăn hỗn hợp

I - Thiết bị, dụng cụ thí nghiệm và hóa chất cần thiết

1. Hóa chất

- Acid acetic (CH_3COOH, Trung Quốc).
- Sodium acetate (CH_3COONa, Trung Quốc).
- Sodium hydroxide (NaOH, Trung Quốc).
- 3,5-dinitrosalicylic acid (Trung Quốc).
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate (Trung Quốc).
- Anhydrous sodium sulfite (Trung Quốc).
- Phenol (Trung Quốc).
- Xylan (Ấn Độ).
- Xylose (Trung Quốc).

2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

- Water bath được cài đặt nhiệt độ 37°C.
- Micro pipet loại 10 - 200 µl, 100 - 1000 µl, 1 - 5 ml.
- Máy quang phổ T6 New Century (UV/VIS) nguồn gốc Trung Quốc được cài đặt bước sóng 540 nm.
- Máy đo pH được hiệu chỉnh 2 ngày 1 lần, đầu dò được bảo quản bằng dung dịch bảo quản điện cực.
- Cân điện tử có độ chính xác là 0,1 mg.
- Máy li tâm.
- Máy lắc ổn nhiệt.
- Máy khuấy từ.
- Vortex.
- Đồng hồ bấm giờ.
- Bếp điện.
- Tủ sấy, tủ lạnh.

- Các dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm như: ống nghiệm, bình định mức 100 ml và 50 ml, beaker, bình tam giác,…

3. Chuẩn bị các dung dịch

a) Acid acetic (CH_3COOH): 0,1 mol/l

Hòa tan 0.6 ml acid acetic với nước cất, định mức thành 100 ml.

b) Sodium acetate (CH_3COONa): 0,1 mol/l

Cân 1,36 g CH_3COONa hòa tan với nước cất, định mức thành 100 ml.

c) Acetate-sodium acetate buffer (CH_3COOH-CH_3COONa): 0,1 mol/l, pH = 5,5

Cân 23,14 g Sodium acetate (CH_3COONa) và 1,7 ml acid acetic (CH_3COOH) cho vào cốc thủy tinh, sau đó thêm nước cất đến 2000 ml.

Chuẩn độ dung dịch trên về pH = 5,5 ± 0,01

d) Dung dịch NaOH (200 g/l)

Cân 20 g NaOH pha loãng với nước cất đến 100 ml.

Lưu ý: Khi pha NaOH phải cẩn thận cần đeo găng tay, khẩu trang và mắt kính.

e) Dung dịch 3,5 - dinitrosalicylic acid (DNS)

Bước 1: Rả đông phenol ở 70 °C.

Bước 2: Dùng một cốc thủy tinh 1000 ml, cho khoảng 500 ml nuốc cất và đặt vào water bath ở 45 °C khoảng 10 phút.

Bước 3: Sử dụng 3 cốc thủy tinh lần lượt cân 3,15 g 3,5-dinitrosalisylic acid, 91 g Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 2,5 g Anhydrous sodium sulfite.

Bước 4: Cho 3,5-dinitrosalisylic acid vào cốc thủy tinh ở bước 2, khuấy đều bằng đũa thủy tinh.

Bước 5: Lấy 100 ml dung dịch NaOH (200 g/l) cho vào, vừa cho vừa khuấy theo dạng phểu.

Bước 6: Tiếp tục cho Potassium sodium tartrate tetrahydrate vào (vừa cho vừa khuấy).

Bước 7: Sử dụng micropipet hút 2,5 ml phenol nhỏ vào (hút lên xuống cho sạch phenol).

Bước 8: Cho Anhydrous sodium sulfite vào và khuấy đều.

Bước 9: Thêm nước cất cho đủ 1000 ml và khuấy đều.

Bước 10: Lấy ra để ở nhiệt độ phòng cho nguội và thỉnh thoảng khuấy lên (đợi khoảng 1 - 2 giờ). Sau đó cho vào bình nâu và trữ trong 7 ngày trước khi sử dụng.

Lưu ý: Dung dịch DNS có giá trị trong 180 ngày.

f) Dung dịch xylan (10 mg/ml)

Bước 1: Cân 1 g xylan và 0,32 g sodium hydroxide (NaOH).

Bước 2: Cho xylan vào cốc đựng sodium hydroxide, dùng nước cất tráng sạch cốc đựng xylan và cho thêm nước cất vào đến 180 ml.

Bước 3: Khuấy và đun hỗn hợp ở bước 2 bằng máy khuấy từ cho tới khi hỗn hợp này tan hoàn toàn và có màu vàng trong suốt. Ngưng đun và tiếp tục khuấy thêm 30 phút.

Bước 4: Thêm từ từ khoảng 0,4 ml acid acetic vào dung dịch trên và chuẩn độ dung dịch về pH = 5,5 ± 0,01 với acid acetic (0,1 mol/l) hoặc sodium acetate (0,1 mol/l) (lưu ý: chuẩn độ từ dưới lên).

Bước 5: Chuyển dung dịch sau khi đã chuẩn độ vào bình định mức 100 ml, định mức bằng dung dịch đệm buffer (0,1 mol/l, pH = 5,5) để thành 100 ml.

Lưu ý: dung dịch xylan sau khi sử dụng còn dư có thể trữ ở 4 °C, tránh ánh sáng và sử dụng trong vòng 3 ngày.

g) Dung dịch gốc xylose (10 mg/ml)

Cân 1 g xylose cho vào bình định mức 100 ml và định mức bằng dung dịch đệm buffer đến 100 ml.

Lưu ý: Xylose trước khi pha thành dung dịch phải sấy 1 - 2 giờ ở 105 °C, cho vào bình hút ẩm rồi mới đem cân và dung dịch xylose trước khi sử dụng phải trộn đều.

h) Pha dung dịch xylose chuẩn: với các mức nồng độ: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml.

Bước 1: Chuẩn bị 7 bình định mức 100 ml, các bình được tráng bằng dung dịch đệm buffer. Sau đó đánh số từ 1 đến 7.

Bước 2: Lần lượt cho dung dịch xylose gốc (10 mg/ml) vào các bình định mức theo thứ tự từ bình 1 đến bình 7 với thể tích là: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml.

Bước 3: Cho thêm dung dịch đệm buffer vào các bình định mức sao cho thể tích dung dịch trong tất cả các bình là 100 ml. Sau đó lắc lên để trộn đều.

4. Xây dựng đường chuẩn Xylose

Chuẩn bị 16 ống nghiệm tương ứng với mỗi nồng độ cần 2 ống nghiệm (14 ống mẫu) và 2 ống trắng, đánh số như sau: 1.1; 1.2; 2.1; 2.2;…; 7.1; 7.2 (14 ống mẫu), C1 và C2 (2 ống đối chứng).

Tiến hành xây dựng đường chuẩn như bảng sau:

Bước thực hiện	**Control**	**Sample**
1. Dung dịch đệm buffer (0,1 mol/l, pH = 5,5 (ml)	2	1
2. Dung dịch xylose chuẩn (ml)	0	1
3. Vortex	✓	✓
4. DNS (ml)	2,5	2,5
5. Vortex	✓	✓
6. Đun sôi cách thủy (phút)	5	5
7. Làm nguội nhanh ống nghiệm dưới vòi nước	✓	✓
8. Nước cất (ml)	8	8
9. Vortex	✓	✓
So màu bằng máy quang phổ với bước sóng 540 nm		

(Control: ống đối chứng; sample: ống mẫu)

Lưu ý:Các bước thực hiện phải theo đúng quy trình từ bước 1 đến bước 9 và thao tác hút lấy dung dịch phải thật chính xác vì nó ảnh hưởng đến kết quả của đường chuẩn.

Yêu cầu đường chuẩn được lập phải có $R^2 \geq 0,99$ (R^2 là hệ số tương quan giữa độ hấp phụ và nồng độ đường xylose.

Làm lại đường chuẩn với mỗi lần làm DNS (3,5-dinitrosalisylic acid) mới vì DNS vừa đóng vai trò là chất làm ngưng phản ứng của enzyme với cơ chất (dung dịch xylan) vừa là chất tạo màu, nên một phần ảnh hưởng đến màu sắc của dung dịch mà ta lại dùng phương pháp so màu để xác định hoạt lực enzyme, với màu sắc khác nhau cho kết quả khác nhau.

II - Quy trình phân tích hoạt lực enzyme Xylanase thuần

1. Chuẩn bị mẫu

Dựa theo bảng gợi ý các giá trị và cân mẫu, cho vào bình tam giác và thêm vào 40 ml dung dịch buffer, lắc trong 30 phút, sau đó thêm dung dịch buffer đến 100 ml, giữ dung dịch này ở nơi tối khoảng 1 - 2 giờ (có hay không có ủ ở nơi tối trong 1 - 2 giờ cũng không sao, có thể bỏ qua bước này). Sau 1 - 2 giờ, hút 30 - 50 ml li tâm khoảng 3 - 5 phút với tốc độ 3.800 vòng/phút, lấy phần chất lỏng phía trên và pha loãng sao cho nồng độ nằm trong phạm vi thích hợp bằng dung dịch buffer (tốt nhất điều khiển hoạt lực của enzyme xylanase trong dung dịch cuối cùng nằm trong giới hạn từ 0,04 - 0,1 U/ml).

Hoạt lực của xylanase (U/g hoặc U/ml)	Lượng mẫu (g hoặc ml)
≥ 2000	0,1 - 0,2
500 - 1999	0,2 - 0,5
200 - 499	0,5 - 1,0
50 - 199	1,0 - 2,0
10 - 49	2,0 - 5,0

Nguồn: Công ty Sunhy

2. Phân tích mẫu

Bước 1: Lấy 10 ml dung dịch xylan cho vào water bath ủ ở 37 °C trong 20 phút.

Bước 2: Lấy 10 ml dung dịch xylanase đã pha loãng cho vào water bath ủ ở 37 °C trong 10 phút.

Bước 3: Chuẩn bị 4 ống nghiệm với 2 ống làm đối chứng (ống control) và 2 ống mẫu (ống sample) cho vào water bath ở 37 °C. Tiến hành xác định hoạt lực xylanase theo bảng dưới đây.

Bước thực hiện	**Control**	**Sample**
1. Dung dịch xylanase ủ 10 phút (ml)	1	1
2. DNS (ml)	2,5	0
3. Vortex	✓	✓
4. Dung dịch xylan ủ 20 phút (ml)	1	1
5. Vortex	✓	✓
6. Ủ 37 °C (phút)	30	30
7. DNS (ml)	0	2,5
8. Vortex	✓	✓
9. Đun sôi cách thủy (phút)	5	5
10. Làm nguội nhanh ống nghiệm dưới vòi nước	✓	✓
11. Nước cất (ml)	8	8
12. Vortex	✓	✓
So màu bằng máy quang phổ ở bước sóng 540 nm		

Lưu ý: Các bước thực hiện phải theo đúng trình tự từ bước 1 đến bước 12.

❖ **Liều lượng sử dụng dùng cho trường hợp mẫu thức ăn có chứa enzyme xylanase 30.000 XU/g, 500 g/tấn thức ăn (độ pha loãng là 20 lần).**

- Cân 1 g mẫu thức ăn hỗn hợp
- Cho vào 20 ml dd Buffer rồi lắc trong 30 phút, tốc độ lắc 100 vòng/phút bằng máy lắc ổn nhiệt.
- Sau khi lắc, lọc lấy phần dung dịch bằng vải mỏng cho vào trong cốc thủy tinh.
- Ly tâm phần dung dịch lọc được với tốc độ 3800 vòng/ phút, trong 3 phút.
- Hút 1 ml dung dịch mẫu lần lượt cho vào các ống Control và Sample.
- Đối với ống Control ta cho vào 2,5 ml dung dịch DNS, sau đó cho các ống Control và Sample vào Water bath ủ ở 37 °C trong 10 phút rồi lấy ra Vortex.
- Tiếp tục ủ thêm 30 phút.
- Sau 30 phút, ta cho 2,5 ml DNS vào các ống Sample và Vortex lại tất cả các ống.
- Đun sôi cách thủy các ống nghiệm trong 5 phút rồi lấy ra làm nguội nhanh dưới vòi nước.
- Cho 8 ml nước cất vào các ống nghiệm rồi Vortex cho đều.
- Đo độ hấp phụ bằng máy quang phổ với bước sóng 540 nm.

Phụ lục 3. Phương pháp phân tích phospho

I. Chuẩn bị dung dịch tro để phân tích phospho

1. Nguyên tắc

Chất khoáng được hòa tan trong dung dịch axit. Lọc lấy dung dịch và loại bỏ phần không tan.

2. Hóa chất và dụng cụ

- Chén sứ
- Cốc đun
- Axit HCl đđ

3. Tiến hành

Thêm khoảng 5 ml axit HCl đđ vào chén sứ có chứa mẫu tro sau khi phân tích khoáng tổng số, chuyển sang cốc đun 250 ml.

Tráng chén sứ nhiều lần với 20 ml nước cất. Đun sôi ở 100 ^{0}C cho bay hơi hết còn khoảng 10 ml. Thêm vào 10 ml nước cất đun khoảng 90 ^{0}C trong vài phút. Làm lạnh và lọc qua giấy lọc vào bình định mức 100 ml. Rửa cốc và giấy nhiều lần bằng nước cất và sau cùng thêm nước cất vào cho đủ 100 ml. Dung dịch này dung để phân tích Ca và P.

II. Phương pháp pân tích phospho

1. Nguyên tắc

Ion orthophosphate phản ứng với ammonium molybdate để tạo thành hợp chất phosphor molybdate.

2. Dụng cụ và hóa chất

- Cân phân tích
- Máy so màu
- Bình định mức
- Pipet
- H_2SO_4 10 N: pha 280 ml H_2SO_4 đđ trong 720ml nước cất.
- Ammonium molybdate: hòa tan 12,5 g ammonium molybdate trong khoảng 100 ml nước cất. Rồi them dung dịch này vào 150 ml dung dịch H_2SO_4 10 N trong bình định mức 500 ml, sau sung thì them nước cất vào cho đến vạch ở miệng bình. Đựng trong chai màu nâu và trữ trong tủ lạnh.
- Dung dịch Sodium bisulfite 15 %: hòa tan 15 g sodium bisulfite trong 100 ml nước cất.
- Amino – napthol sulfonic acid (ANSA): cân 250 mg (0,25 g) 1 – amino – 2 naphthol – 4 sulfonic acid cho vào 1 cái cốc. Thêm vài giọt sodium bisulfite 15 %, trộn đều. Rồi them 97,5 ml dung dịch sodium bisulfite 15 % và 2,5 ml dung dịch sodium sulfite 20 %. Nếu amino – napthol sulfonic acid chưa tan hết thì thêm vào mỗi lần 0,5 ml sodium sulfite 20 % cho đến khi tan hoàn toàn, nhưng không nên thêm quá nhiều. Để lắng qua đêm, lọc đựng trong chai nâu.

3. Tiến hành thực hiên đường chuẩn

- Hòa tan 0,4394 g KH_2PO_4 trong 300 ml nước cất. (1)

- Axit sulfuric/nước cất theo tỷ lệ 1/35 (6 ml H_2SO_4 đđ/210 ml nước cất). Lấy 200 ml (2)

- (1) + (2) + vài giọt $KMnO_4$: pha đúng 1 lít. Mỗi ml có chứa 0,1 mg P (đây là dung dịch mẹ)

- Đường chuẩn có chứa

0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg P trong 50 ml dung dịch, nghĩa là lấy

0,1 0,5 1 2 3 4 5 ml ở dung dịch mẹ 0,1 mg P cho vào bình định mức rồi tiến hành làm P như bình thường.

- Ghi lại số liệu để viết phương trình tương quan y = ax với

y = A độ đo bước song 650 nm

x = C nồng độ P trong 7 mẫu

4. Tiến hành đo P của mẫu

- Dùng pipette hút một lượng dung dịch tro có chứa khoảng 0,01 – 0,2 mg phospho vào bình định mức 50 ml (trung bình khoảng 0,1 – 0,5 ml).

- Thêm khoảng 25 ml nước cất + 5 ml ammonium molybdate, lắc kỹ.

- Thêm 2 ml ANSA + nước cất đến vạch ở miệng bình. Đậy nắp, lắc kỹ.

- Đo độ hấp thu của phospho ở độ dài song 650 nm sau khi thêm ANSA đúng 20 phút.

- Trong suốt quá trình tiến hành phải làm mẫu trắng (không có dung dịch tro) để tính kết quả cuối cùng.

Tính kết quả

- Sau khi tiến hành đường chuẩn ta đo được phương trình tương quan

- Kết quả của mẫu được tính bằng cách lấy số đo đọc được – số đo của mẫu trắng sau đó thay vào phương trình đã có sẵn để tính kết quả.

Phụ lục 4: Kết quả xử lý thống kê

Phụ bảng 4.1: Bảng phân tích hoạt lực enzyme phytase thuần trung bình

Descriptive Statistics: HL Phytase thuần

Variable	N	Mean	StDev	CoefVar
HL Phytase thuần	10	7240.3	46.5	0.64

Phụ bảng 4.2: Bảng phân tích hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Descriptive Statistics: HL Phytase trong TAHH

Variable	N	Mean	StDev	CoefVar
HL Phytase trong TAHH	10	529.40	25.84	4.88

Phụ bảng 4.3: Bảng phân tích hoạt lực enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme xylanase

Descriptive Statistics: HL Phytase trong TAHH + Xylanase

Variable	N	Mean	StDev	CoefVar
HL Phytase trong TAHH + Xylanase	10	455.40	11.17	2.45

Phụ bảng 4.4: Bảng phân tích tỷ lệ giải phóng phospho của enzyme phytase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Descriptive Statistics: TLGP phospho từ TAHH+P, TLGP phospho từ TAHH+P+X

Variable	N	Mean	StDev	CoefVar
TLGP phospho từ TAHH+P	10	16.949	1.198	7.07
TLGP phospho từ TAHH+P+X	10	14.659	0.359	2.45

One-way ANOVA: TLGP phospho versus Trường hợp

Source	DF	SS	MS	F	P
Trường hợp	1	26.217	26.217	33.51	0.000
Error	18	14.082	0.782		
Total	19	40.299			

S = 0.8845 R-Sq = 65.06% R-Sq(adj) = 63.12%

Level	N	Mean	StDev
TAHH+Phytase	10	16.949	1.198
TAHH+Phytase+Xylanase	10	14.659	0.359

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

```
Level                  ---------+---------+---------+---------+
TAHH+Phytase                                    (----*-----)
TAHH+Phytase+Xylanase  (-----*----)
                       ---------+---------+---------+---------+
                             15.0      16.0      17.0      18.0
```

Pooled StDev = 0.884

Grouping Information Using Tukey Method

Trường hợp	N	Mean	Grouping
TAHH+Phytase	10	16.9492	A
TAHH+Phytase+Xylanase	10	14.6593	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

```
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%


Trường hợp = TAHH+Phytase subtracted from:
Trường hợp               Lower   Center    Upper
TAHH+Phytase+Xylanase  -3.1209  -2.2899  -1.4588

Trường hợp               -+---------+---------+---------+--------
TAHH+Phytase+Xylanase    (-------*-------)
                         -+---------+---------+---------+--------
                       -3.0      -2.0      -1.0       0.0
```

Phụ bảng 4.6: Bảng phân tích hoạt lực enzyme xylanase thuần

Descriptive Statistics: HL Xylanase thuần

```
Variable            N    Mean  StDev  CoefVar
HL Xylanase thuần  10  3223.8  133.0     4.12
```

Phụ bảng 4.7: Bảng phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp

Descriptive Statistics: HL Xylanase trong TAHH

```
Variable                 N    Mean  StDev  CoefVar
HL Xylanase trong TAHH  10  1585   38.6     2.43
```

Phụ bảng 4.8: Bảng phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong thức ăn hỗn hợp có bổ sung enzyme phytase

Descriptive Statistics: HL Xylanase trong TAHH + Phytase

```
Variable                           N    Mean  StDev  CoefVar
HL Xylanase trong TAHH + Phytase  10  1675.1   40.7     2.43
```

Phụ bảng 4.11: Bảng phân tích tỷ lệ giải phóng xylose và năng lượng nhờ enzyme xylanase khi sử dụng riêng lẻ và khi kết hợp với enzyme phytase trong thức ăn hỗn hợp

Descriptive Statistics: TLGP xylose , TLGP xylose , NL xylose từ, NL xylose từ

```
Variable                 N    Mean   StDev  CoefVar
TLGP xylose từ TAHH+X    10  16.709   0.407     2.43
TLGP xylose từ TAHH+X+P  10  17,660   0.428     2.43
NL xylose từ TAHH+X      10  29.280   0.713     2.43
NL xylose từ TAHH+X+P    10  30.947   0.751     2.43
```

One-way ANOVA: TLGP Xylose versus Trường hợp

```
Source      DF     SS     MS      F      P
Trường hợp   1  4.525  4.525  25.92  0.000
Error       18  3.142  0.175
Total       19  7.667
S = 0.4178   R-Sq = 59.02%   R-Sq(adj) = 56.74%

Level                   N    Mean  StDev
TAHH+Xylanase          10  16.709  0.407
TAHH+Xylanase+Phytase  10  17.660  0.428

                      Individual 95% CIs For Mean Based on
```

```
                        Pooled StDev
Level                   ---------+---------+---------+---------+
TAHH+Xylanase           (------*------)
TAHH+Xylanase+Phytase                       (------*-----)
                        ---------+---------+---------+---------+
                              16.80     17.20     17.60     18.00
Pooled StDev = 0.418

Grouping Information Using Tukey Method
Trường hợp              N     Mean  Grouping
TAHH+Xylanase+Phytase  10  17.6603  A
TAHH+Xylanase          10  16.7090    B
Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%

Trường hợp = TAHH+Xylanase subtracted from:
Trường hợp              Lower  Center   Upper
TAHH+Xylanase+Phytase  0.5588  0.9513  1.3438
Trường hợp              --------+---------+---------+---------+-
TAHH+Xylanase+Phytase                    (-------*-------)
                        --------+---------+---------+---------+-
                              0.00      0.50      1.00      1.50
```

One-way ANOVA: NL xylose versus Trường hợp

```
Source      DF      SS      MS      F      P
Trường hợp   1  13.889  13.889  25.90  0.000
Error       18   9.652   0.536
Total       19  23.541
S = 0.7323   R-Sq = 59.00%   R-Sq(adj) = 56.72%

Level                   N    Mean  StDev
TAHH+Xylanase          10  29.280  0.713
TAHH+Xylanase+Phytase  10  30.947  0.751
                        Individual 95% CIs For Mean Based on
                        Pooled StDev
Level                   ---------+---------+---------+---------+
TAHH+Xylanase           (------*------)
TAHH+Xylanase+Phytase                       (------*------)
                        ---------+---------+---------+---------+
                              29.40     30.10     30.80     31.50
Pooled StDev = 0.732

Grouping Information Using Tukey Method
Trường hợp              N     Mean  Grouping
TAHH+Xylanase+Phytase  10  30.9465  A
TAHH+Xylanase          10  29.2799    B
Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%

Trường hợp = TAHH+Xylanase subtracted from:
Trường hợp              Lower  Center   Upper
TAHH+Xylanase+Phytase  0.9786  1.6667  2.3547
Trường hợp              ---------+---------+---------+---------+
TAHH+Xylanase+Phytase                      (--------*-------)
                        ---------+---------+---------+---------+
                               0.00      0.80      1.60      2.40
```

Phụ bảng 4.13: Bảng phân tích hoạt lực enzyme xylanase thuần được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Descriptive Statistics: HL Xylanase thuần của CTX

```
Variable                   N   Mean  StDev  CoefVar
HL Xylanase thuần của CT  10  13956    617     4.42
```

Phụ bảng 4.14: Bảng phân tích hoạt lực enzyme xylanase trong mẫu thức ăn dạng bột được công ty sản xuất thức ăn X sử dụng

Descriptive Statistics: HL Xylanase mẫu A , HL Xylanase mẫu A1, HL Xylanase mẫu B, HL Xylanase mẫu B1, HL Xylanase mẫu C, HL Xylanase mẫu C1

```
Variable             N    Mean  StDev  CoefVar
HL Xylanase mẫu A   10  3822.0  183.4     4.80
HL Xylanase mẫu A1  10  3156.0  283.1     8.97
HL Xylanase mẫu B   10    4134    465    11.25
HL Xylanase mẫu B1  10  3312.0  157.0     4.74
HL Xylanase mẫu C   10  4014.0  234.0     5.83
HL Xylanase mẫu C1  10  3390.0  198.5     5.86
```

One-way ANOVA: HL Xylanase versus Trường hợp

```
Source      DF       SS       MS      F      P
Trường hợp   1  2217780  2217780  38.98  0.000
Error       18  1024200    56900
Total       19  3241980
S = 238.5   R-Sq = 68.41%   R-Sq(adj) = 66.65%
                            Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Level    N    Mean  StDev     +---------+---------+---------+---------
Mẫu A   10  3822.0  183.4                                 (-----*-----)
Mẫu A1  10  3156.0  283.1     (-----*------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            3000      3250      3500      3750
Pooled StDev = 238.5

Grouping Information Using Tukey Method
Trường hợp   N    Mean  Grouping
Mẫu A       10  3822.0  A
Mẫu A1      10  3156.0    B
Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%

Trường hợp = Mẫu A subtracted from:
Trường hợp   Lower  Center   Upper     +---------+---------+---------+---------
Mẫu A1      -890.1  -666.0  -441.9     (-------*------)
                                       +---------+---------+---------+---------
                                    -900      -600      -300         0
```

One-way ANOVA: HL Xylanase versus Trường hợp

```
Source      DF       SS       MS      F      P
Trường hợp   1  3378420  3378420  28.04  0.000
Error       18  2169000   120500
Total       19  5547420
```

```
S = 347.1   R-Sq = 60.90%   R-Sq(adj) = 58.73%

                          Individual 95% CIs For Mean Based on
                          Pooled StDev
Level    N    Mean  StDev   --+---------+---------+---------+-------
Mẫu B   10  4134.0  465.1                          (-----*------)
Mẫu B1  10  3312.0  157.0   (------*-----)
                            --+---------+---------+---------+-------
                          3150      3500      3850      4200

Pooled StDev = 347.1

Grouping Information Using Tukey Method
Trường hợp   N    Mean  Grouping
Mẫu B       10  4134.0  A
Mẫu B1      10  3312.0    B
Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%

Trường hợp = Mẫu B subtracted from:
Trường hợp    Lower  Center   Upper  ---------+---------+---------+---------+
Mẫu B1      -1148.2  -822.0  -495.8  (--------*--------)
                                     ---------+---------+---------+---------+
                                           -800      -400         0       400
```

One-way ANOVA: HL Xylanase versus Trường hợp

```
Source      DF       SS       MS      F      P
Trường hợp   1  1946880  1946880  41.35  0.000
Error       18   847440    47080
Total       19  2794320
S = 217.0   R-Sq = 69.67%   R-Sq(adj) = 67.99%
                          Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Level    N    Mean  StDev     +---------+---------+---------+---------
Mẫu C   10  4014.0  234.0                              (-----*----)
Mẫu C1  10  3390.0  198.5     (-----*----)
                              +---------+---------+---------+---------
                          3250      3500      3750      4000
Pooled StDev = 217.0

Grouping Information Using Tukey Method
Trường hợp   N    Mean  Grouping
Mẫu C       10  4014.0  A
Mẫu C1      10  3390.0    B
Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trường hợp
Individual confidence level = 95.00%

Trường hợp = Mẫu C subtracted from:
Trường hợp   Lower  Center   Upper  --------+---------+---------+---------+-
Mẫu C1      -827.9  -624.0  -420.1  (------*------)
                                    --------+---------+---------+---------+-
                                         -600      -300         0       300
```

BỘ GIÁO DỤC và ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
KHOA CHĂN NUÔI – THÚ Y

****

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

ĐÁNH GIÁ HOẠT LỰC ENZYME PHYTASE, ENZYME XYLANASE TRONG SẢN PHẨM ENZYME THUẦN VÀ TRONG THỨC ĂN HỖN HỢP KHI SỬ DỤNG RIÊNG LẺ HAY KHI PHỐI HỢP CHUNG

Sinh viên thực hiện: NGUYỄN QUANG VINH
Lớp: DH12TY
Ngành: THÚ Y
Niên khóa: 2012-2017

Tháng 08/2017

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
KHOA CHĂN NUÔI THÚ Y

BÁO CÁO THỰC TẬP XÍ NGHIỆP DƯỢC

THỰC TẬP TẠI NHÀ MÁY SẢN XUẤT THUỐC THÚ Y – THỦY SẢN CỦA CÔNG TY TNHH SX & TM MEBIPHA

Giáo viên hướng dẫn: ThS. ĐẶNG XUÂN THIỆP

07/2017