

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**



TỔNG THỊ MƠ

**NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CHẾ
PHẨM MULTIENTZYMES TỪ NẤM MỐC VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ
AN TOÀN CỦA CHÚNG DÙNG CHO CHĂN NUÔI**

LUẬN VĂN THẠC SỸ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên, Năm 2010

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



TỔNG THỊ MƠ

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CHẾ
PHẨM MULTIENTZYMES TỪ NẤM MỐC VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ
AN TOÀN CỦA CHÚNG DÙNG CHO CHĂN NUÔI

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC – VI SINH
Mã số: 60 42 80

LUẬN VĂN THẠC SỸ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS.MAI THỊ HẰNG

Thái Nguyên, Năm 2010

L I C M N

Qua m t th i gian làm vi c và h c t p t i Phòng thí nghi m B môn Công ngh Sinh h c ã Vi sinh tôi Lã hoàn thành công trình: ***“Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm Multienzym từ nấm mốc và đánh giá độ an toàn của chúng dùng cho chăn nuôi”***

ñ hoàn thành L c công trình này, tôi Lã nh n L c nhi u s giúp L , ch b o và Lóng góp ý ki n quý báu t các th y cô, gia Lình và các b n L ng nghi p.

Tôi xin bày t lòng bi t n sâu s c Ti n s B Mai Th H ng, ng i Lã d y d tôi trong quá trình h c t p, ng i Lã dìu d t nh ng b c Li L u tiên trong con L ng khoa h c và luôn sát cánh cùng tôi trong quá trình nghiên c u!

Tôi xin chân thành c m n các anh chị em b môn V sinh Thú y, Vi n Thú y trung ng Lã giúp L tôi trong quá trình làm thí nghi m t i Vi n!

Tôi chân thành c m n t t c anh, ch em phòng Công ngh Sinh h c ã Vi sinh Lã giúp L tôi trong su t th i gian qua!

Xin chân thành c m n!

Hà N i, tháng 09 n ãm 2010

Tổng Thị Mơ

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	<i>i</i>
1. Lý do chọn đề tài.....	<i>1</i>
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	<i>2</i>
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	<i>2</i>
4. Nội dung của đề tài:.....	<i>3</i>
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	<i>4</i>
1. Vai trò của enzyme trong chăn nuôi.....	<i>4</i>
1.1 Các enzyme tiêu hóa chủ yếu sử dụng trong chăn nuôi.....	<i>4</i>
1.1.1 α -Amylase.....	<i>5</i>
1.1.1.1. Đặc tính của enzym α -amylase	<i>5</i>
1.1.1.2. Cơ chế tác động của enzym α -amylase.....	<i>7</i>
1.1.2 Cellulase.....	<i>9</i>
1.1.2.1 Hệ enzyme phân giải cellulose	<i>10</i>
1.1.2.2. Endoglucanase (EC.3.2.1.4, β -Dglucan-glucanolhydrolase hay carboxymethylcellulase viết tắt là CMCase).....	<i>10</i>
1.1.2.3. Exoglucanase (EC.3.2.1.91. 1,4 β - glucan – celobiohydrolase.....	<i>11</i>
1.1.2.4. β -1,4 glucosidase (EC.3.2.1.21 β -1,4 glucosidase hay celobiase):.....	<i>11</i>
1.1.2.5. Exoglucohydrolase (EC.3.2.1.74): 1,4 β -D glucan – glucohydrolase)	<i>12</i>
1.1.3. Xylanase	<i>12</i>
1.1.3.1. Cấu trúc hoá học của xylan.....	<i>12</i>
1.1.3.2. Hệ thống enzyme phân giải xylan và sự hình thành tổ hợp xylanase ở vi sinh vật	<i>14</i>
1.1.4. Phytase	<i>16</i>
1.2 Tình hình nghiên cứu sử dụng enzyme trong chăn nuôi.....	<i>17</i>
2. Các phương pháp lên men enzyme vi sinh vật.....	<i>21</i>
2.1. phương pháp lên men chìm	<i>21</i>

2.2. Phương pháp lên men rắn	22
3. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh tổng hợp enzyme.....	23
3.1. Ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng.....	23
3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy	25
4. Tính an toàn của các chế phẩm enzyme từ <i>Aspegillus</i>	26
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1. Vật liệu	29
2.1.1. Chủng vi sinh vật.....	29
2.1.2. Môi trường sử dụng trong nghiên cứu.....	29
2.1.3. Hoá chất.....	29
2.1.4. Thiết bị.....	30
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	30
2.2.1. Phương pháp vi sinh.....	30
2.2.1.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn tinh bột đến khả năng sinh amylase trên cơ chất bã sắn của chủng <i>A. oryzae</i> NMI	31
2.2.1.2. Ảnh hưởng của độ ẩm ban đầu đến khả năng sinh amylase	31
2.2.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 và KH_2PO_4 lên khả năng sinh amylase	32
2.2.1.4 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng sinh amylase.....	32
2.2.1.5 Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của amylase.....	32
2.2.1.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của amylase.....	33
2.2.1.7 Ảnh hưởng của lượng giống (bào tử/g) ban đầu đến khả năng sinh amylase	33
2.3. Xác định ảnh hưởng của H_2O_2 đến hoạt động của amylase	33
2.4. Phương pháp nghiên cứu enzyme.....	34
2.4.1. Xác định hoạt tính một số loại enzyme thuỷ phân ngoại bào	34
3. Đánh giá độ an toàn của chế phẩm enzyme trên động vật	40

3.1 Đánh giá độ độc cấp tính.....	40
3.2. Đánh giá độc tính cấp khi sử dụng enzyme liều cao trong 7-14 ngày.....	43
3.3. Đánh giá độc tính chậm khi sử dụng enzyme liều cao trong 90 ngày.....	44
3.4. Tính toán và xử lý số liệu.....	44
3.5 Các phương pháp khác.....	45
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	46
3.1 Ảnh hưởng các yếu tố dinh dưỡng đến sinh tổng hợp amylase.....	46
3.1.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn tinh bột đến khả năng sinh amylase trên cơ chất bã sắn của chủng <i>A. oryzae</i> NMI.....	46
3.1.2 Ảnh hưởng của độ ẩm ban đầu đến khả năng sinh amylase.....	48
3.1.3 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng sinh amylase	49
3.1.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ ban đầu đến khả năng sinh amylase.....	51
3.1.5 Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh amylase.....	52
3.1.6. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 và KH_2PO_4 đến khả năng sinh amylase	53
3.1.7 Ảnh hưởng của số lượng bào tử ban đầu đến khả năng sinh amylase.....	54
3.2 Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm amylase thô.....	56
3.3 Phối trộn enzyme thô từ chủng <i>A. niger</i> DB106 và enzyme thô từ chủng <i>A. oryzae</i> NMI.....	60
3.4. Đánh giá độ an toàn của chế phẩm enzyme multienzyme trên động vật.....	62
3.4.1.Đánh giá cấp độ độc cấp tính	62
a. Dị ứng da	62
b. Dị ứng mắt.....	63
c. Dị ứng đường thở.....	63
3.4.2 Đánh giá độc tính cấp chậm 14 ngày.....	64
3.4.3. Đánh giá độc tính 90 ngày.....	64

3.4.4. Kết quả kiểm tra mẫu máu: Kiểm tra tại Khoa huyết học của Bệnh viện Bạch Mai Hà Nội (Bảng 3.4.4)	65
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	68
I. KẾT LUẬN.....	68
II. KIẾN NGHỊ.....	68
TÀI LIỆU THAM KHẢO	69

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

CMC	Carboxyl methyl cellulose
CNSH	Công nghệ sinh học
Cs	Công suất
DNS	Dinitro Salysilic
IU	International units
KLPT	Khả năng phân tích
OD	Optical Density
OSX	Oat Spelt Xylan
CTM	Công thức máu
RNM	Ứng dụng phẩm nhuộm
VSV	Vì sinh vật
RBC	Hồng cầu
WBC	Bạch cầu
PLT	Tiểu cầu
TN	Thí nghiệm
MT	Môi trường
MTCS	Môi trường cấy

DANH MỤC HÌNH

Hình

Tên hình

Trang

Hình 1	Cấu trúc hoá học của cellulose	9
Hình 2	C u trúc c a xylan v i các chu i bên	14
Hình 3	S L tác L ng c a các lo i enzyme th y phân xylan trình bày tóm t t	15
Hình 4	Mu i phytate và các liên k t v i ion kim lo i và protein	16
Hình 2.4	ñ th tinh b t chu n	35
Hình 2.5	ñ th chu n xác L nh hàm l ng D-glucose b ng DNS	37
Hình 2.6	ñ th chu n D-xylose (Theo ph ng pháp DNS)	39
Hình 3.1.2	nh h ng c a L m ban L u L n kh n ^ñ ng sinh amylase	49
Hình 3.1.3	nh h ng c a th i gian lên men L n kh n ^ñ ng sinh amylase	50
Hình 3.1.4	nh h ng c a nhi t L ban L u L n kh n ^ñ ng sinh amylase	52
Hình 3.1.5	nh h ng c a pH d ch khoáng ban L u L n kh n ^ñ ng sinh amylase	53
Hình 3.2	Quy trình s n xu t ch ph m amylase thô t A. oryzae NM1	59