

NGHIÊN CỨU THU NHẬN LEVAN TỪ *BACILLUS SUBTILIS* VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT THỨC ĂN GÀ CẢNH GIAI ĐOẠN 1 - 14 NGÀY TUỔI

Lê Anh Tú¹, Trần Đình Đức¹, Nguyễn Thị Lan Anh¹, Vũ Kim Dung¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Levan là hợp chất polymer sinh học được tổng hợp từ vi khuẩn trên môi trường có thành phần chính là sucrose. Levan cung cấp nguyên liệu cho hàng loạt các ngành công nghiệp trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: y dược, thực phẩm và mỹ phẩm. Ứng dụng tiềm năng của levan để làm chất nhũ hóa dùng trong sữa, chất ổn định, chất làm đặc, và đặc biệt là có khả năng phục hồi sức khỏe và có giá trị trong các liệu pháp điều trị ung thư... Ngoài ra, levan còn được ứng dụng trong ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi, làm tăng khả năng tiêu hóa và thay thế sử dụng các chất kháng sinh. Nghiên cứu này nhằm xác định điều kiện thích hợp để thu nhận levan từ canh trường nuôi cấy. Dịch canh trường nuôi cấy sau khi ly tâm loại bỏ sinh khối được trộn với ethanol theo tỷ lệ dịch lọc: ethanol là 1:3 ở nhiệt độ -5°C trong 3 giờ sẽ cho hàm lượng levan cao nhất. Bước đầu ứng dụng sản xuất thức ăn chăn nuôi cho cám gà con giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi bổ sung chế phẩm levan 0,1% và nhiệt độ ép viên 70°C cho kết quả chất lượng cám tốt nhất và đạt theo tiêu chuẩn Việt Nam cho phép.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, levan, polymer, thức ăn chăn nuôi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Levan là một polymer của fructose được tạo ra bởi liên kết β - (2 - 6) fructo - furanosidic (Ki-Hyo và cộng sự, 2001; Mardo và cộng sự, 2014), có thể được sản xuất bởi cả thực vật, nấm men, nấm và vi khuẩn (Jang và cộng sự, 2001). Các nghiên cứu chỉ ra levan có khả năng chống ung thư (Calazans và cộng sự, 1997). Levan được sản xuất từ *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* và *Zymomonas mobilis* có khả năng chống lại tám dòng khác nhau của tế bào ung thư (El-Safty và cộng sự, 2012). Nhiều nghiên cứu về levan đã được thúc đẩy bởi vai trò của chúng trong điều trị sâu răng (Arvidson và cộng sự, 2006) và làm giảm cholesterol (Yamamoto và cộng sự, 1999), điều hòa các hoạt động miễn dịch trong cơ thể (Calazans và cộng sự, 1997). Levan được ứng dụng như một chất làm ngọt trong các sản phẩm sử dụng cho bệnh nhân tiểu đường (Jaecho và cộng sự, 2001).

Trong những năm gần đây, việc sử dụng kháng sinh làm chất kích thích tăng trưởng trong thức ăn đã bị cấm hoàn toàn hoặc một phần ở một số quốc gia. Việc sử dụng fructan được sản xuất từ levan giúp cải thiện khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng, tăng hiệu suất tăng trưởng, tránh viêm nhiễm (Li và cộng sự, 2013) và tăng số lượng vi khuẩn axit lactic trong phân của lợn

cai sữa (Xin và cộng sự, 2017).

Với rất nhiều những ứng dụng mang tính thực tế và thân thiện với môi trường (Poli và cộng sự, 2009) levan đang trở thành đối tượng được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm và nghiên cứu nhằm thu nhận được sản lượng ở mức cao nhất, ứng dụng trong nhiều ngành sản xuất. Việc bổ sung dinh dưỡng trong chế độ ăn cho gà cảnh hay chế phẩm sinh học trong khẩu phần ăn, đặc biệt là giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi là giai đoạn sức đề kháng kém, nhạy cảm dễ tăng tỷ lệ chết. Bổ sung dinh dưỡng trong giai đoạn này một cách hợp lý sẽ phù hợp với sự phát triển của gà và giúp cân bằng được dinh dưỡng, tăng sức đề kháng, tăng lợi khuẩn cho đường ruột cũng như cân đối về ngoại hình phục vụ cho mục đích sử dụng. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu thu nhận levan từ *Bacillus subtilis* và bước đầu ứng dụng sản xuất thức ăn chăn nuôi cho gà cảnh giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi nhằm tìm được điều kiện thu nhận levan thích hợp và xác định được hàm lượng levan bổ sung vào thức ăn cho gà cảnh đạt được các tiêu chuẩn về chế biến và cảm quan.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* natto từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Công nghệ vi sinh - hóa sinh do Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Đại

học Lâm nghiệp cung cấp.

Môi trường L₁ (cao thịt 3 g/l, peptone 5 g/l) được sử dụng để hoạt hóa *B. subtilis* natto. Môi trường nhân giống (L₂): cao thịt (3 g/l), peptone (1,5 g/l), NaCl (5 g/l). Môi trường sinh tổng hợp levan: sucrose (80 g/l), cao nấm men (2,3 g/l), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/l), NaH₂PO₄.2H₂O (3 g/l), Na₂HPO₄.12H₂O (3 g/l).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sinh tổng hợp levan

Quá trình sinh tổng hợp levan của *B. subtilis* natto được thực hiện theo phương pháp của Jothi và cộng sự (2019). Theo đó, vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường L₁, nhân giống trên môi trường L₂ tại nhiệt độ 37^oC trong thời gian 48 giờ, nuôi lắc 120 vòng/phút. Sau đó cấy giống với tỷ lệ giống cấp 7,5% vào môi trường sinh tổng hợp levan và nuôi lắc với tốc độ 120 vòng/phút, nhiệt độ 37^oC trong thời gian 24 giờ.

2.2.2. Thu nhận levan

Dịch canh trường nuôi cấy *B. subtilis* được ly tâm loại sinh khối, sau đó nghiên cứu thu nhận levan bằng phương pháp kết tủa với các loại dung môi: ethanol 96^o, iso propanol và acetone. Tiến hành kết tủa theo tỉ lệ thể tích dịch chiết levan với dung môi là 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 để hỗn hợp ở -5^oC, 0^oC và 32^oC trong 1 giờ, 3 giờ, 5 giờ để tạo kết tủa levan. Tiến hành lọc và thu levan trong kết tủa theo phương pháp của Santos và cộng sự (2013).

2.2.3. Xác định hàm lượng levan

Levan thu được sau khi kết tủa bằng ethanol 96^o được thủy phân bằng HCl 1M ở 100^oC trong 1 giờ. Dịch thủy phân được trung hòa bằng NaOH 2M và hàm lượng fructose được xác định bằng phản ứng tạo màu với DNS và đo ở bước sóng 540 nm (Berte và cộng sự, 2013).

Do levan là polymer của fructose nên hàm lượng levan được tính theo công thức: $L = F \times 0,9$ (Szwengiel và cộng sự, 2004; Santos và cộng sự, 2013). Trong đó: L: hàm lượng levan (g/l); F: hàm lượng fructose (g/l); 0,9: hệ số chuyển đổi.

2.2.4. Xây dựng quy trình sản xuất cám gà cảnh bổ sung levan (giai đoạn 1-14 ngày tuổi)

- Xác định tỷ lệ levan phối trộn: Sử dụng công thức cám cho gà con giai đoạn 1-14 ngày tuổi như bảng 1 tại Công ty Cổ phần chăn nuôi

C.P Việt Nam (đối chứng) sau đó bổ sung levan với hàm lượng 0,1% (Công thức 1); 0,2% (Công thức 2) và 0,3% (Công thức 3) sau đó lựa chọn chế độ dinh dưỡng phù hợp.

- Xác định nhiệt độ ép viên: Sau khi lựa chọn được công thức cám bổ sung levan sẽ tiến hành phối trộn và ép viên. Nhiệt độ lựa chọn cho máy ép viên gồm 3 mức: 70^oC, 80^oC, 90^oC để xác định hàm lượng levan còn lại theo từng mức nhiệt độ trên thông qua hàm lượng đường tổng số (*Becrorang*) và các chỉ tiêu ảnh hưởng đến chất lượng cám quan của cám thành phẩm tại Công ty Cổ phần chăn nuôi C.P Việt Nam.

Bảng 1. Thành phần nguyên liệu trong công thức cám gà con giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi

TT	Loại nguyên liệu	Tỷ lệ (%)
1	Ngô nghiền	60,10
2	Khô đậu tương	12,50
3	Khô hạt cải	1,80
4	Cám gạo	6,20
5	Cám mì	14,90
6	Đá bột	0,80
7	Muối	0,40
8	Dầu cá	0,70
9	Lysin	0,04
10	L-Therionine	0,06
11	Premix vitamin + khoáng	2,48

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần và các số liệu thu được xử lý sai số bằng phần mềm Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát các yếu tố đến quá trình thu nhận levan

3.1.1. Ảnh hưởng của các loại dung môi

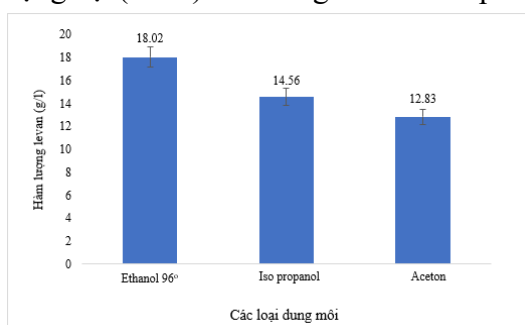
Theo Beste và cộng sự (2014) việc thu nhận các hợp chất polysaccharides từ thực vật ảnh hưởng rất lớn bởi các loại dung môi. Chính vì thế, tiến hành nghiên cứu đối với ba loại dung môi: ethanol 96^o, iso propanol, acetone đến khả năng tạo kết tủa của levan và việc lựa chọn các loại dung môi này đều có hằng số điện môi nhỏ nên không làm phân tán tới các phân tử trong dung dịch.

Kết quả hình 1 cho thấy khả năng kết tủa levan của ethanol 96^o hiệu quả hơn so với iso propanol và acetone. Mặt khác, khi kết tủa levan

bằng ethanol 96° có nhiều thuận lợi do ethanol 96° là hợp chất an toàn cho sản phẩm thu được (Kang và cộng sự, 1979). Hơn nữa, ethanol 96° có sẵn ở dạng tinh khiết với ít tạp chất gây nhiễm độc hay ức chế. Nhiệt độ bay hơi của dung môi ethanol thấp nên dễ tách bỏ dung môi khỏi chế phẩm enzym bằng phương pháp sấy nhẹ bằng quạt gió.

Nghiên cứu của Jothi và cộng sự (2019) đã

thử nghiệm ảnh hưởng của các dung môi khác nhau: ethanol, isopropanol, acetone, methanol lên hàm lượng levan thu được, kết quả đã cho thấy dung môi kết tủa bằng ethanol cho hàm lượng levan lớn nhất. Kết quả này tương đồng với kết quả thí nghiệm khi lựa chọn dung môi ethanol 96° để kết tủa sinh tổng hợp levan. Vì vậy, lựa chọn dung môi ethanol 96° cho các nghiên cứu tiếp theo.

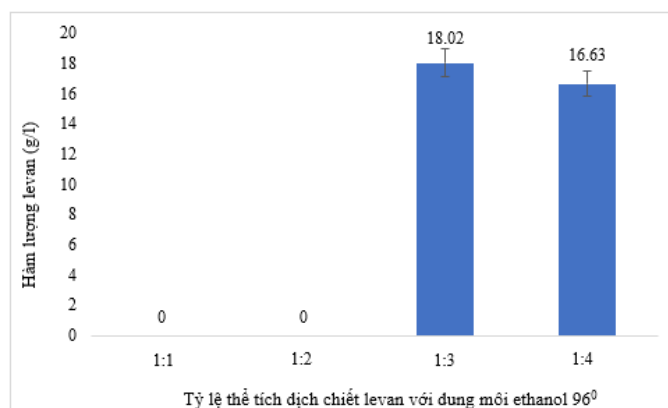


Hình 1. Hàm lượng levan thu được theo loại dung môi

3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích dịch chiết levan và dung môi đến hàm lượng levan thu được

Sau khi đã lựa chọn được dung môi kết tủa ethanol 96° cho hàm lượng levan cao nhất, tiếp tục lựa chọn các tỷ lệ thể tích dịch chiết levan và dung môi lần lượt 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 để xác định hàm lượng levan thu được theo từng tỷ lệ

này. Kết quả hàm lượng levan thu được thể hiện ở hình 2. Qua kết quả ở hình 2 cho thấy, khi thể tích dịch chiết levan và dung môi ở tỷ lệ 1:1 và 1:2 thì kết tủa tạo thành rất ít và ở dạng nhầy, không thể lọc được kết tủa. Khi tỷ lệ thể tích dịch chiết levan và dung môi 1:3 cho hàm lượng levan thu được là cao nhất (18,02 g/l) cao hơn so với tỷ lệ 1:4 (16,63 g/l).



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích dịch chiết và dung môi đến hàm lượng levan

(Ghi chú: giá trị 0 – không lọc được kết tủa)

Năm 2013, tác giả Bruna và cộng sự khi nghiên cứu các điều kiện sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* Natto CCT 7712 cho thấy với tỷ lệ thể tích levan và dung môi ethanol 96° là 1:3, điều kiện nhiệt độ 4°C trong thời gian 12 giờ thu được hàm lượng levan cao nhất. Cũng trong nghiên cứu của Gabrielly và cộng sự (2017)

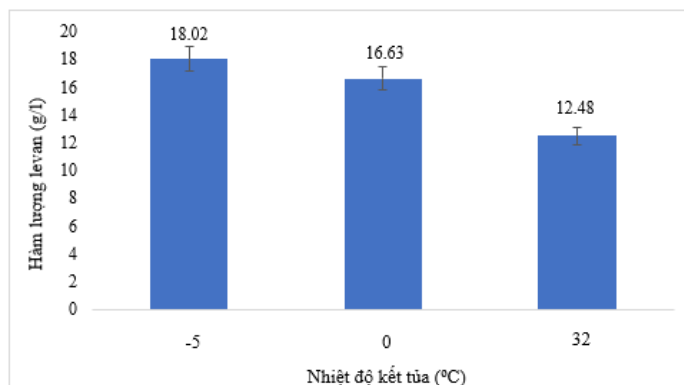
đã lựa chọn tỷ lệ 1:3 (tỷ lệ thể tích levan và dung môi ethanol) cho quá trình sinh tổng hợp levan và fructooligosaccharides từ chủng *B. subtilis* Natto. Các kết quả này tương đồng với kết quả của nghiên cứu khi sử dụng tỷ lệ thể tích dịch chiết levan với dung môi ethanol 96° là 1:3 thu được hàm lượng levan cao nhất. Chính vì vậy,

lựa chọn tỷ lệ này cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ở mỗi mức nhiệt độ khác nhau đều có ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng levan kết tủa thu được. Do đó, với các điều kiện thu nhận levan đã được xác định bằng cách sử dụng dung môi

kết tủa ethanol 96°, tỷ lệ thể tích dịch chiết levan và dung môi bằng 1:3, tiếp tục xác định nhiệt độ kết tủa hỗn hợp lỏng này ở các nhiệt độ: -5°C, 0°C và 32°C. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ kết tủa đến hàm lượng levan được thể hiện ở hình 3.

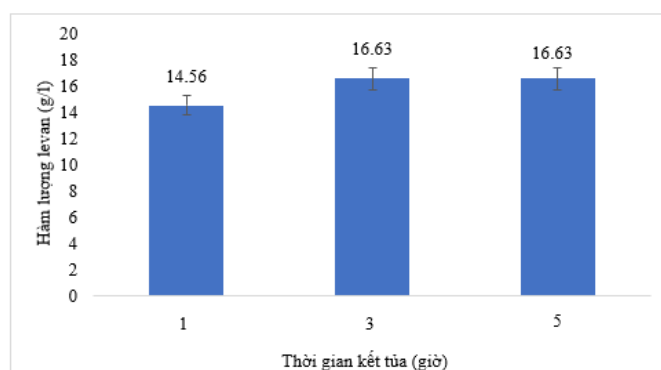


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ kết tủa đến hàm lượng levan

Kết quả ở hình 3 cho thấy, khi kết tủa ở nhiệt độ -5°C, hàm lượng levan thu được cao nhất (18,02 g/l). Nhiệt độ kết tủa 0°C sẽ làm cho hàm lượng levan giảm dần (16,63 g/l) và ở nhiệt độ môi trường (32°C) hàm lượng levan thu được thấp nhất (12,48 g/l). Khi nghiên cứu tối ưu các điều kiện thu nhận levan từ chủng *B. subtilis* Natto, Santos và cộng sự (2013) cho rằng hàm lượng levan thu được cao nhất khi lựa chọn kết tủa levan bằng dung môi ethanol ở nhiệt độ -5°C. Do vậy, lựa chọn nhiệt độ kết tủa -5°C cho nghiên cứu tiếp theo.

3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa đến hàm lượng levan thu được

Nghiên cứu này lựa chọn các thời gian kết tủa 1 giờ, 3 giờ và 5 giờ với các điều kiện đã xác định: sử dụng dung môi kết tủa ethanol 96°, tỷ lệ thể tích dịch chứa levan và dung môi bằng 1:3 và nhiệt độ kết tủa -5°C. Kết quả hàm lượng levan thu được thể hiện ở hình 4 cho thấy hàm lượng levan tăng lên (16,63 g/l) khi tăng thời gian lên 3 giờ so với thời gian kết tủa ngắn (1 giờ; 14,56 g/l).



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa đến hàm lượng levan

Trong nghiên cứu của Manel và cộng sự (2018) khi đánh giá hiệu quả của việc sử dụng kết tủa bằng ethanol của exopolysaccharides có sử dụng ba loại vi khuẩn acid lactic nhận thấy,

khi tăng thời gian lên thì hiệu suất kết tủa không tăng. Tương tự quy luật thay đổi đối với độ tinh sạch cũng tăng khi tăng thời gian. Tuy nhiên, khi tăng thời gian đến mức tới hạn thì độ tinh

sạch giảm. Điều này có thể do thời gian càng kéo dài thì càng tạo điều kiện cho sự tập hợp của các phân tử tại vùng pH đẳng điện và làm tăng lượng kết tủa. Tuy vậy, kéo dài đến một thời gian xác định thì không làm tăng số lượng kết tủa, nên cũng không làm tăng hiệu suất kết tủa. Ngoài ra, một số polysaccharide cũng có thể bị kết tủa khi pH thay đổi trong thời gian dài cũng làm giảm độ tinh sạch của sản phẩm. Do đó trong nghiên cứu này, khi tăng thời gian kết tủa lên 5 giờ cũng không làm tăng hàm lượng levan thu được. Vì vậy, lựa chọn thời gian kết tủa 3 giờ để thu nhận levan.

3.2. Nghiên cứu quy trình sản xuất cám gà cảnh từ chế phẩm levan (giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi)

3.2.1 Xác định tỷ lệ levan phối trộn

Gà con trong giai đoạn 1 - 14 ngày tuổi có lượng tế bào tăng lên mạnh mẽ nên quá trình sinh trưởng diễn ra rất nhanh, một số cơ quan chưa phát triển hoàn chỉnh như các men tiêu hóa chưa đầy đủ, khả năng điều tiết thân nhiệt kém, gà con dễ bị ảnh hưởng bởi thức ăn và quá trình nuôi dưỡng. Vì vậy thức ăn có đủ hàm lượng dinh dưỡng ảnh hưởng rất lớn đến gà con trong thời kì này.

Bảng 2. Kết quả phân tích dinh dưỡng cám trong công thức

Thành phần dinh dưỡng (%)	Công thức đối chứng	Công thức 1	Công thức 2	Công thức 3
M	11,5 ± 0,03	11,5 ± 0,03	11,4 ± 0,03	11,4 ± 0,03
CP	21,8 ± 0,03	21,8 ± 0,03	21,9 ± 0,03	22,0 ± 0,03
Fat	4,7 ± 0,02	4,7 ± 0,02	4,6 ± 0,02	4,7 ± 0,02
Fib	2,3 ± 0,011	2,3 ± 0,011	2,4 ± 0,011	2,4 ± 0,011
GE (kcal/kg)	3120 ± 1,5	3140 ± 1,5	3158 ± 1,5	3177 ± 1,5
Ca	0,71 ± 0,005	0,70 ± 0,005	0,71 ± 0,005	0,72 ± 0,005
P	0,77 ± 0,005	0,77 ± 0,005	0,76 ± 0,005	0,77 ± 0,005
Lysin	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,005	0,04 ± 0,005

Ghi chú: M (Moisture), CP (Crude Protein), Fat (Fat), Fib (Fiber), GE (Gross Energy), Ca (Calcium), P (Phosphorus).

Dựa vào kết quả ở bảng 2 cho thấy ở tất cả các công thức khi bổ sung levan đều không có sự thay đổi đáng kể với các chỉ tiêu: M, CP, Fat, Fib, Ca, P, Lysin.

Trong dinh dưỡng gia cầm năng lượng được xem là nguồn dinh dưỡng giới hạn nhất vì nhu cầu lớn so với các chất dinh dưỡng khác. Nhu cầu năng lượng của gia cầm có thể xác định là mức năng lượng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển và cho duy trì mọi hoạt động sống của cơ thể. Thiếu năng lượng dẫn đến sự suy giảm các quá trình trao đổi và các hoạt động chức năng cơ thể khiến gia cầm còi cọc, chậm lớn, năng suất giảm.

Năng lượng trong công thức 3 đạt mức cao nhất (3177 kcal/kg) cao hơn so với công thức đối chứng (3120 kcal/kg), công thức 1 (3140 kcal/kg), công thức 2 (3148 kcal/kg). Tuy nhiên, xét về mức độ giá thành cho chế phẩm levan bổ sung vào thức ăn chăn nuôi thì tỷ lệ 0,1% trong công thức 1 đem lại hiệu quả hơn do không làm

tăng giá nhiều trong cám thành phẩm. Kết quả này cũng khá tương đồng với việc bổ sung các chế phẩm prebiotic (0,1%) vào trong thức ăn cho lợn trong giai đoạn nhỏ (Li và cộng sự, 2013) hay việc bổ sung tỷ lệ 0,0075% chế phẩm prebiotic vào giai đoạn gà đẻ giai đoạn 1-35 ngày tuổi (Lensing và cộng sự, 2012).

3.2.2. Nghiên cứu xác định nhiệt độ ép viên

Trong toàn bộ quy trình sản xuất thức ăn chăn nuôi, hệ thống ép viên có vai trò quan trọng, quyết định tính chất dinh dưỡng, hình dạng, độ bền, độ cứng, độ bụi của viên cám. Ngoài ra, nhiệt độ trong máy ép viên cũng ảnh hưởng tới hoạt động của vi sinh vật, các chất dinh dưỡng, enzyme trong nguyên liệu, enzyme bổ sung thêm vào thức ăn chăn nuôi. Chính vì vậy, trong quá trình ép viên khi nhiệt độ quá cao sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng levan còn lại trong cám thành phẩm, gây hao hụt và mất chất dinh dưỡng. Do vậy, nghiên cứu này sẽ giúp lựa chọn được nhiệt độ ép viên thích hợp để giữ được

hàm lượng levan cao nhất sau khi ép viên. Thí nghiệm nhiệt độ được thực hiện bằng máy cảm viên thuộc phòng sản xuất Công ty cổ phần chăn nuôi C.P. Việt Nam, phân tích hàm lượng levan

dựa trên xác định hàm lượng đường tổng số trong mẫu cám thành phẩm, phân tích các chỉ tiêu dinh dưỡng, chỉ tiêu cảm quan và các chỉ tiêu vi sinh cho kết quả theo các bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích thành phần dinh dưỡng khi bổ sung chế phẩm levan

Chỉ tiêu (%)	Công thức đối chứng			Công thức bổ sung levan		
	70°C	80°C	90°C	70°C	80°C	90°C
Đường tổng số	6,29 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,29 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,36 ± 0,01	6,36 ± 0,01
M	11,5 ± 0,05	11,0 ± 0,05	10,8 ± 0,05	11,5 ± 0,05	11,1 ± 0,05	10,8 ± 0,05
CP	21,8 ± 0,05	21,5 ± 0,05	20,9 ± 0,05	21,9 ± 0,05	21,5 ± 0,05	21,0 ± 0,05
Fat	4,8 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Fib	2,3 ± 0,05	2,2 ± 0,05	2,0 ± 0,05	2,3 ± 0,05	2,1 ± 0,05	2,0 ± 0,05
GE (Kcal/kg)	3120 ± 2,5	3121 ± 2,5	3123 ± 2,5	3140 ± 2,5	3141 ± 2,5	3140 ± 2,5
Ca	0,71 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,69 ± 0,05
P	0,77 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,77 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,70 ± 0,05
Lysin	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001

Ghi chú: M (Moisture), CP (Crude Protein), Fat (Fat), Fib (Fiber), GE (Gross Energy), Ca (Calcium), P (Phosphorus).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra cảm quan thức ăn chăn nuôi khi bổ sung levan

Chỉ tiêu	Công thức đối chứng			Công thức 1		
	70°C	80°C	90°C	70°C	80°C	90°C
Độ bền (%)	98,0 ± 0,5	95,6 ± 0,6	94,3 ± 0,5	98,0 ± 0,6	95,6 ± 0,5	94,4 ± 0,5
Độ cứng (kg)	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Độ bụi (%)	2,0 ± 0,1	4,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1

Bảng 5. Kết quả phân tích vi sinh thức ăn chăn nuôi bổ sung levan

Chỉ tiêu	Công thức đối chứng			Công thức 1		
	70°C	80°C	90°C	70°C	80°C	90°C
Tổng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)	3.2x10 ⁴	<10 ³	<10 ³	3x10 ⁴	<10 ³	<10 ³
Tổng nấm men, nấm mốc (CFU/g)	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
<i>Samonella</i> (CFU/25g)	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (CFU/g)	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
<i>Aspergillus</i> (CFU/1g)	0	0	0	0	0	0
<i>Coliform</i> (CFU/g)	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹

Ghi chú: Kết quả hiển thị <10¹ CFU/g khi không có khuẩn lạc mọc trên đĩa.

Từ kết quả bảng 3 nhận thấy các thành phần dinh dưỡng cơ bản bao gồm: CP, Fat, Fib, GE, Ca, P, Lysin đều không có sự thay đổi. Tuy nhiên, do nhiệt độ ép viên tăng cao từ 70 - 90°C làm cho độ ẩm cám bị giảm dần từ 11,5% (70°C) xuống còn 10,8% (90°C) nguyên nhân do tác dụng của nhiệt cao làm khô nguyên liệu đồng thời lượng nước bốc hơi nhanh qua tác động của khuôn ép. Hàm lượng đường tổng số của công

thức đối chứng và công thức 1 đều không bị ở mức nhiệt độ 70°C đến 90°C. Ở cả 3 mức nhiệt vẫn đảm bảo giữ được hàm lượng đường tổng số trong mẫu cám là 6,35 - 6,36% và cao hơn so với cùng nhiệt độ này ở công thức đối chứng.

Tiêu chuẩn cảm quan và tính chất vật lý của sản phẩm cám bổ sung levan (bảng 4) cho thấy khi tăng nhiệt độ ép viên lên cao dần từ 80°C đến 90°C làm cho viên cám có màu sẫm hơn so

với mức 70°C. Điều này có thể lý giải do mức nhiệt quá cao làm các chất trong nguyên liệu như đường, tinh bột, cellulose... bị phá hủy và làm ảnh hưởng tới mùi vị của cám thành phẩm. Các chỉ tiêu về độ bền, độ cứng, độ bụi cũng cho thấy, khi tăng nhiệt độ lên cao làm cho viên cám bị mất dần độ ẩm, ở mức nhiệt độ 80°C và 90°C làm cho viên cám cứng hơn nhưng dễ bị gãy do va đập, không đạt tiêu chuẩn về độ bền và độ bụi cho phép. Vì vậy, ở mức nhiệt độ ép viên 70°C đạt yêu cầu chất lượng về cảm quan và chất lượng sản phẩm.

Bên cạnh đó, kết quả bảng 5 nhận thấy các vi khuẩn *E. coli*, *Coliform* đều nằm trong giới hạn của TCVN (QCVN 01 - 190), tổng lượng vi khuẩn hiếu khí, tổng nấm men, nấm mốc nằm trong khoảng 10³ đến 3,2x10⁴ CFU/g và nằm trong TCVN cho phép (QCVN 01 - 190). Các vi khuẩn *Salmonella* và *Aspergillus* nhận thấy không có sự xuất hiện của khuẩn lạc mọc trên đĩa.

Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của tác giả Ward và cộng sự (2020) khi đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ đến thành phần dinh dưỡng của cám ép viên, mức nhiệt được tác giả lựa chọn thích hợp mức 70 - 77°C để tiêu diệt được hết các vi khuẩn có hại nhưng vẫn đảm bảo được hàm lượng amino acid, enzyme trong thành phẩm và mức nhiệt trên 85°C được chứng minh là làm giảm khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng ở gà thịt (Borojoni và cộng sự, 2014). Thêm vào đó, nhiệt độ trên 70°C cũng làm giảm khả năng hoạt động của enzyme phytase có trong nguyên liệu và enzyme bổ sung vào cám thành phẩm (Jongbloed và cộng sự, 1990) làm enzyme bị biến tính, có ảnh hưởng đến khả năng tiêu hóa của động vật (Gehring và cộng sự, 2011).

4. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu nghiên cứu các điều kiện thu nhận levan từ *B. subtilis* và bước đầu ứng dụng sản xuất thức ăn chăn nuôi cho gà cảnh giai đoạn 1-14 ngày tuổi bài báo đã xác định được dung môi hữu cơ kết tủa levan là ethanol 96° với tỷ lệ thể tích dịch levan và dung môi là 1:3, nhiệt độ kết tủa -5°C trong thời gian 3 giờ. Tỷ lệ bổ sung levan trong thức ăn chăn nuôi cho gà cảnh giai đoạn 1-14 ngày tuổi là 0,1% và nhiệt độ ép viên cám thành phẩm 70°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arvidson S.A., Rinehart B.T., Gadala M.F (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* spp. *Carbohydr Polymes*, 65, 144 - 149.
2. Berte D., Borsato P.S., Sila J. A.R, Celligoi M.A.P.C. (2013). Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. *African Journal of Microbiology Reseach*, 7 (10), 898 - 905.
3. Borojoni F.G, Mader A., Knorr F., I. Ruhnke I., Röhe I., Hafeez A., Männer K., Zentek J. (2014). The effects of different thermal treatments and organic acid levels on nutrient digestibility in broilers Poult. *Poult Sci*, 93(5):1159-71.
4. Bruna C.M.G., Janaina M., Mara L.L.R., Dionísio B., Maria A.P.C.C. (2013). Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1 (02): 001-008.
5. Calazans C.E.L., Lima R.M.O.C., Franca F.P. (1997). Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letter*, 19: 19 - 21.
6. El-Safty E., Ahmed E.F., Helmy W.A., Mansour N.M., El-Senousy W.M. (2012). Antiviral levans from *Bacillus* spp. isolated from honey. *Intech DoI*, 10: 5772 – 5248.
7. Gabrielly T.B., Nicole C.P., Cristiani B., Maria A.P.C.C. (2017). Co-production of fructooligosaccharides and levan by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with potential application in the food industry. *Appl Biochem Biotechnol*, 184(3):838-851.
8. Gehring C.K., Lilly K.G.S., Shires L.K., Beaman K.R., Loop S.A., Moritz J.S. (2011). Increasing mixer-added fat reduces the electrical energy required for pelleting and improves exogenous enzyme efficacy for broiler. *J. Appl. Poult. Res*, 20: 75-89.
9. Jaecho C., Hee P.N., Jae Y.S., Ho L.T. (2001). Molecular and enzymatic characterization of levan fructotransferase from *Microbacterium* sp. AL - 210. *J Biotechnol*, 91: 49 - 61.
10. Jang K.H, Song K.B., Kim C.H., Chung B.H., Kang S.A., Chun U.H., Choue R.W., Rhee S.K. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by diferent preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letter*, 23, 339 – 344.
11. Jongbloed A.W., Kemme P.A. (1990). Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs *Anim. Feed Sci. Technol*, 28: 233-242.
12. Jothi S.C.A.C., Bhuvaneshwari V., Kartik K.S., Krishna P.M., Saravanan R.S., Ponnusami V. (2019). Studies on solvent precipitation of levan synthesized using *Bacillus subtilis* MTCC 441. *Heliyon*, 5(10): 02678.

13. Kang, Cottrell I.W. (1979). Polysaccharides. In Pepler H. J. and Perlman D. (ed), Microbial technology, 2nd ed. Academic Press, Inc, New York, 418 - 481.
14. Ki-Hyo J., Ki-Bang S., Chul H.K., Bong H.C., Soon A.K., Uck-Han C., Ryo W.C., Sang-Ki R. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*, 23: 339 – 344.
15. Lensing M., Klis J., Yoon I., Moore D.T. (2012). Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intestinal health and productivity of coccidian-challenged laying hens. *Poult Sci*, 91:1590–7.
16. Li J., Kim H. (2013). Effects of Levan-type fructan supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota, and immune responses after lipopolysaccharide challenge in growing pigs. *Journal of animal science*, 91(11):5336-43.
17. Manel Z., Taroub B., Sana M., Kaouther Z., Ferid M., Mokhtar H., Claire B.H. (2018). Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by three lactic acid bacteria. *BioMed Research International* 2018: 1-11.
18. Mardo K., Visnapuu T., Gromkova M., Aasamets A., Viigand K., Vija H., Alamäe T. (2014). High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Molecules*, 19: 8434-8455.
19. Poli A., Kazak H., Gürleyendağ B., Tommonaro G., Pieretti G., Toksoy Ö.E. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydr Polym* 78:651–657.
20. QCVN 01 - 190: 2020/BNNPTNT. *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia thức ăn chăn nuôi - hàm lượng tối đa cho phép các chỉ tiêu an toàn trong thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu sản xuất thức ăn thủy sản*.
21. Santos L.F.D., Melo F., Paiva W.J.M., Borsato D., Dasilva M., Celligoi M. (2013). Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* (Natto). *Rom Biotech Lett*, 18: 8413 - 8422.
22. Szwengiel A., Czarnecka M., Roszyk H., Czarnecki Z. (2004). Levan production by *Bacillus subtilis* DSM 347 strain. *Food Sci Technol Int* 2: 7 - 12.
23. Ward N.E., Ayres L.A.E., Moritz J.S. (2020). The effect of varying steam conditioning temperature and time on pellet manufacture variables, true amino acid digestibility, and feed enzyme recovery. *J. Appl. Poult. Res.* 29:328–338.
24. Xin J.L., Yong M.K., Jae H.P., Dong H.B., Charles M.N., In H.K. (2017) Effects of levan-type fructan on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, faecal shedding of total lactic acid bacteria and *Coliform* bacteria, and faecal gas emission in weaning pig. *J Sci Food Agric.* 98 (4): 1539-1544.
25. Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Saeki S., Yamaguchi H. (1999). In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rat. *J. Nutr. Biochem*, 10: 13 - 18.

STUDIES ON CONDITIONS RECEIVING OF LEVAN SYNTHESIZED USING *BACILLUS SUBTILIS* AND INITIALLY APPLIED TO PRODUCE FEED FOR CHICKS IN THE PERIOD OF 1 - 14 DAYS OF AGE

Le Anh Tu¹, Tran Dinh Duc¹, Nguyen Thi Lan Anh¹, Vu Kim Dung¹

¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Levan is a bio-polymer compound synthesized by bacteria on the medium with sucrose. Levan supplies raw materials to a wide range of industries in various fields such as medicine, food and cosmetics. The potential application of levan for emulsifying agents used in milk, stabilizers, thickeners, and in particular, has the ability to restore health and valuable in cancer therapies... It is also used in the animal feed industry, increasing digestibility and replacing antibiotics. This study aims to determine the conditions receiving of levan from the culture medium. The fluid after centrifugation eliminates biomass mixed with ethanol in a ratio of filtrate: ethanol is 1: 3 at -5°C for 3 hours will give the highest level of levan. Initially applied to produce feed for chicks in the period of 1 - 14 days of age, supplemented with 0.1% levan preparations and 70°C hot pellet for the best quality bran results and reached Vietnamese standards allows.

Keywords: Animal feed, *Bacillus subtilis*, levan, polymer.

Ngày nhận bài : 19/6/2020

Ngày phản biện : 29/6/2020

Ngày quyết định đăng : 02/7/2020