

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

LÊ HƯƠNG THỦY

**NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN BÃ RONG CÂU
(*Gracilaria verrucosa*) BẰNG ENZYM CELLULASE TỪ VI
KHUẨN ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT THỨC ĂN NUÔI
CÁ RÔ PHI ĐƠN TÍNH GIAI ĐOẠN THƯƠNG PHẨM**

**Ngành đào tạo : Công nghệ chế biến thủy sản
Mã số : 62540105**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA - 2017

Công trình được hoàn thành tại Trường Đại học Nha Trang

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS. TSKH. Nguyễn Trọng Cần

Trường Đại học Nha Trang

2. PGS. TS. Vũ Ngọc Bội

Trường Đại học Nha Trang

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Duy Thịnh

Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội

Phản biện 2: PGS.TS. Lại Văn Hùng

Trường Đại học Nha Trang

Phản biện 3: TS. Nguyễn Duy Nhứt

Viện nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp trường

họp tại Trường Đại học Nha Trang

vào hồi 8 giờ, ngày 21 tháng 10 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Nha Trang

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Lê Hương Thủy (2009), “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học tận dụng bã thải từ sản xuất agar phục vụ sản xuất thức ăn chăn nuôi”, *Hội thảo Khoa học Đánh giá kết quả thực hiện đề tài, dự án Công nghệ Sinh học Nông nghiệp - Thủy sản giai đoạn 2007 - 2008*, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Tr. 193-195.

2. Võ Hoài Bắc, Lê Hương Thủy, Lê Thị Lan Oanh (2010), “Sàng lọc chủng vi sinh vật sinh cellulase sử dụng trong thủy phân bã thải agar”, *Bản tin Viện Nghiên cứu Hải sản*, Số 15, tr 20 – 24.

3. Lê Hương Thủy, Võ Hoài Bắc, Lê Thị Lan Oanh (2011), “Tối ưu hóa các điều kiện sinh cellulase ngoại bào từ 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B-505 và *Bacillus licheniformis* Li trên môi trường lên men công nghiệp”, *Bản tin Viện Nghiên cứu Hải sản*, Số 19, tr. 20 - 25.

4. Lê Hương Thủy (2011), “Nghiên cứu ứng dụng bã rong thủy phân trong sản xuất thức ăn nuôi cá rô phi”, *Bản tin Viện Nghiên cứu Hải sản*, Số 22, tr. 19 -26.

5. Lê Hương Thủy, Võ Hoài Bắc (2011), “Nghiên cứu sàng lọc và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy các chủng vi sinh vật sinh cellulase sử dụng trong thủy phân bã thải agar”, *Tạp chí KH-CN Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, Tr. 140 – 148.

6. Lê Hương Thủy (2013), Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học tận dụng bã thải sản xuất agar phục vụ sản xuất thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí KH-CN Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. Tr 275 - 284.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết

Rong biển là loại nguyên liệu có chứa nhiều chất tự nhiên có giá trị cao và được sử dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, y dược và thực phẩm như: agar, carrageenan,... Trong công nghệ chế biến các sản phẩm từ rong biển thì công nghệ sản xuất agar từ rong câu được chú ý nghiên cứu nhiều do agar sử dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống... Trên thế giới, ước tính sản lượng agar vào khoảng 7.000 - 10.000 tấn/năm. Ở Việt Nam, sản lượng rong tươi vào khoảng 3000 tấn/ năm, phần lớn được dùng để sản xuất agar và carrageenan. Hàng năm, nước ta sản xuất khoảng 500 tấn agar. Trong quá trình chế biến agar, lượng phế thải hữu cơ thải ra môi trường rất cao vào khoảng 6 - 8 tấn phế thải/1 tấn sản phẩm, như vậy ước tính lượng phế thải từ quá trình chế biến rong ở nước ta vào khoảng 7000-9000 tấn. Bã thải rong có chứa một lượng lớn chất hữu cơ nên khi thải ra môi trường thường bị phân hủy gây mùi hôi thối và ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Vì vậy việc nghiên cứu tìm kiếm hướng xử lý và tận thu một cách hợp lý nguồn bã thải rong là cần thiết góp phần hạn chế ô nhiễm môi trường và tận dụng nguồn phế thải hữu cơ này một cách hiệu quả.

Trong bã thải rong thường chứa protein, các khoáng chất có nguồn gốc từ biển như iod, phosphate, các nguyên tố vi lượng hữu ích cho sự sinh trưởng phát triển của động vật nuôi. Đặc biệt, trong bã rong có chứa một lượng lớn cellulose – đây là thành phần khó tiêu hoá đối với động vật. Do vậy nghiên cứu công nghệ sản xuất thức ăn chăn nuôi cá từ bã rong phế thải sẽ mang lại hiệu quả kinh tế vì giúp tận dụng lượng phế thải này một cách có hiệu quả. Nhưng quan trọng hơn cả là giúp giảm thiểu nguy cơ gây ô nhiễm môi trường. Ngoài ra còn giúp tiết kiệm chi phí xử lý chất thải cho các nhà máy chế biến agar. Do vậy việc nghiên cứu tận dụng bã rong câu mang tính cấp bách trong thực tế sản xuất hiện nay.

Từ những yêu cầu thực tiễn nêu ra ở trên, chúng tôi đó tiến hành thực hiện đề tài “*Nghiên cứu thủy phân bã rong câu (Gracilaria verrucosa) bằng enzyme cellulase từ vi khuẩn để ứng dụng trong sản xuất thức ăn nuôi cá rô phi đơn tính giai đoạn thương phẩm*”.

2. Ý nghĩa thực tiễn của luận án

Luận án lần đầu tiên ở Việt Nam sử dụng enzyme cellulase từ vi khuẩn trong xử lý bã thải rong sau sản xuất agar và sử dụng dịch thủy phân bã rong làm thức ăn nuôi cá rô phi. Luận án có ý nghĩa khoa học cao do kết quả nghiên cứu của Luận án đã khẳng

định hoàn toàn có thể ứng dụng enzyme cellulase để chuyển bã thải rong sau sản xuất agar thành sản phẩm hữu ích dùng trong nuôi cá rô phi ở quy mô công nghiệp. Thành công của đề tài có ý nghĩa về thực tiễn cao bởi giúp giảm thiểu ô nhiễm môi trường từ công nghệ sản xuất agar và giúp nâng cao giá trị của rong câu chỉ vàng, giảm chi phí sản xuất trong nuôi cá rô phi và đem lại hướng mới trọng tận dụng bã thải rong sau chế biến.

3. Mục tiêu của luận án

Sử dụng phế thải rong câu trong sản xuất Agar để tạo ra nguồn nguyên liệu bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

4. Nội dung nghiên cứu của luận án

1) *Đánh giá lượng bã thải rong và xác định thành phần cơ bản của bã thải rong sau sản xuất agar.*

2) *Sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh cellulase cao từ bộ sưu tập giống vi khuẩn của Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.*

3) *Thu nhận chế phẩm enzyme cellulase thô từ chủng vi khuẩn đã lựa chọn và ứng dụng thủy phân bã rong câu (*Gracilaria verrucosa*) sau sản xuất agar*

4) *Thử nghiệm sử dụng sản phẩm thủy phân bã rong bằng enzyme cellulase từ vi khuẩn trong sản xuất thức ăn nuôi cá rô phi đơn tính giai đoạn thương phẩm.*

5. Tính mới của luận án

Từ 17 chủng vi sinh vật giống có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào đã được Viện Công nghệ Sinh học và trường Đại học Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia khảo sát, đã sàng lọc được 2 chủng vi sinh vật sinh enzyme cellulase Cx ngoại bào có hoạt tính cao nhất là *Bacillus licheniformis* (Li) và *Bacillus subtilis* VTCC-B-505 để thủy phân cellulose của bã thải rong câu sử dụng vào sản xuất thức ăn chăn nuôi góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường, giảm chi phí xử lý phế thải và mang lại nguồn thức ăn quý giá cho vật nuôi.

6. Bố cục của luận án

Luận án bao gồm 127 trang, được chia làm 3 chương, 33 bảng số liệu, 24 hình, 9 sơ đồ, 10 biểu đồ và 146 tài liệu tham khảo (Tiếng Việt 40 tài liệu, Tiếng Anh 102 tài liệu, tài liệu tra cứu trên internet 4 tài liệu).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Ở những nước có nền kinh tế phát triển người ta chăn nuôi gia súc, gia cầm theo phương thức công nghiệp do đó đòi hỏi cung cấp một lượng lớn thức ăn với chất lượng cao, ổn định, hệ số hấp thụ cao và giá thành rẻ. Do vậy việc tận dụng các nguồn phế liệu để sản xuất thức ăn cho chăn nuôi giá thành rẻ đang được coi là tính chiến lược. Nhiều quốc gia đã tận dụng nguồn phụ phẩm nông nghiệp làm nguồn nguyên liệu cung cấp chất xơ trong sản xuất thức ăn gia súc. Phụ phẩm nông nghiệp là những sản phẩm phụ thu từ được từ cây trồng như: rơm lúa, thân ngô, thân lạc, ngọn mía, bã mía, cỏ khô, bã sắn,... Nguồn phụ liệu này thường nghèo chất dinh dưỡng, hàm lượng chất xơ cao, tỷ lệ tiêu hóa thấp khi dùng làm thức ăn chăn nuôi.

Sản lượng agar thế giới ước tính đạt khoảng 7.000 đến 10.000 tấn/năm. Theo số liệu thống kê năm 1992 sản lượng rong đỏ trên thế giới là 1.256.981 tấn (Fao year book of fishery statistic, 1992), sản lượng agar sản xuất và tiêu thụ năm 1984 là 6685 tấn (Coppen, 1989). Đặc thù của công nghệ sản xuất Agar lượng phế thải hữu cơ tương đối cao khoảng 6 tấn phế thải/1 tấn sản phẩm. Nếu không được tận thu sẽ gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng và lãng phí nguồn phế liệu.

Qua các tài liệu và việc khảo sát hiện trạng xử lý các chất thải tại các cơ sở sản xuất Agar cho thấy, việc xử lý bã thải Agar ít được quan tâm. Đặc biệt là chất thải hữu cơ, đó là bã rong có chứa một lượng nước cao, chất hữu cơ dễ phân huỷ thối rữa gây mùi chua thối độc hại cho con người. Vì vậy, đây là một vấn đề bức xúc và cần được giải quyết càng sớm càng tốt.

Thành phần và hàm lượng các chất trong bã thải agar phụ thuộc vào quy trình công nghệ sản xuất agar, nhưng nhìn chung chứa 15 -20% là chất khô, độ ẩm khoảng 75-80%. Thành phần chất khô có trong bã rong bao gồm khoảng 40-50% hợp chất hữu cơ, chủ yếu là cellulose (sơ sợi), chất dinh dưỡng, protein 4 – 5 % và 50-60% hợp chất vô cơ, trong đó, có khoảng 55% muối vô cơ không tan trong nước và nhiều nguyên tố vi lượng. [10]

Nhiều nghiên cứu khoa học cho thấy, phần lớn lượng protein của rong đỏ tồn tại ở dạng hợp chất với glucid. Do đó, muốn sử dụng hiệu quả protein trong rong để phục vụ chăn nuôi bã rong cần phải xử lý hoá học hoặc sử dụng của công nghệ sinh học lên men phân giải để phá huỷ liên kết của nhóm ngoại glucid với phân tử protein trong phức hợp

glucoprotein. Khi đó, enzyme protease trong động vật mới có thể tiêu hoá và hấp thụ protein đồng thời với các thành phần hữu ích khác.

Số lượng các loài vi sinh vật tham gia sinh tổng hợp enzyme cellulase có trong điều kiện tự nhiên rất phong phú. Chúng thuộc nấm sợi, xạ khuẩn, vi khuẩn và trong một số trường hợp, các nhà khoa học còn thấy cả nấm men cũng tham gia quá trình phân giải này. Các chủng vi sinh vật có hoạt tính cellulase rất có ý nghĩa và có nhiều ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn như ứng dụng rộng rãi trong đời sống.

Hải Phòng là nơi tập trung các xưởng sản xuất agar, tính chung các quy mô khác nhau có khoảng 40 xưởng với tổng sản lượng agar ước tính sản xuất đạt 500 tấn/năm với tổng doanh thu khoảng 60 tỷ đồng và giải quyết công ăn việc làm cho hàng nghìn lao động và vấn đề xử lý phế thải đang là vấn đề nan giải cho các nhà máy sản xuất agar. Các bã thải này đa số là được xử lý bằng cách đào hố chôn vùi hoặc ủ làm phân bón cho cây trồng gây ra mùi hôi thối, ô nhiễm môi trường khu vực sản xuất và dân cư. Các cơ sở sản xuất người dân sinh sống gần nơi đổ phế thải và các nhà quản lý rất quan tâm đến việc xử lý phế thải nói trên. Việc tận dụng nó làm nguồn nguyên liệu để sản xuất thức ăn chăn nuôi vừa có ý nghĩa thực tiễn, kinh tế và bảo vệ môi trường

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

2.1.1. Bã thải rong sau sản xuất agar

Bã thải rong sau sản xuất agar được thu nhận từ cơ sở sản xuất agar của Công ty TNHH SX & TM Hoàng Yên phường Lãm Hà, Quận Kiến An, thành phố Hải Phòng. Sau quá trình nấu chiết thu agar, bã agar được loại thải qua giai đoạn lọc khung bản. Mẫu được lấy ngẫu nhiên giữa các lần nấu chiết sau đó ép để giảm bớt hàm lượng nước và bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

2.1.2. Giống vi sinh vật sinh cellulase

Các chủng vi sinh vật sinh cellulase sử dụng trong quá trình nghiên cứu được lấy từ bộ sưu tập giống vi sinh vật sinh cellulase của Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.1.3. Cá rô phi giống

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích

- + Xác định hàm lượng protein theo TCVN 4328-1:2007 (ISO 5983-1:2005).
- + Xác định hàm lượng nước theo TCVN 4326:2001 (ISO 6596:1999).
- + Xác định hàm lượng tro theo TCVN 4327:2007 (ISO 5984:2002).
- + Xác định hàm lượng cellulose AOAC No 973.09.1997/TCVN 4329:2007 (ISO 6865:2000).
- + Xác định hàm lượng lipit TCVN 4331:2001.
- + Xác định nấm mốc độc theo HPLC 3.19-05-2/CL1/ST.
- + Xác định NaCl theo TCVN 4330:1986.
- + Xác định Canxi theo TCVN 1526: 2007.
- + Xác định Phospho theo TCVN 1525 - 2001.
- + Phân tích các nguyên tố kim loại trên máy quang phổ hấp phụ nguyên tử

2.2.2. Các phương pháp thu nhận và xác định hoạt tính cellulase

2.2.2.1. Phương pháp thu nhận enzym cellulase thô

2.2.2.2. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp xác định đường khử

2.2.3.3. Phương pháp xác định độ bền của chế phẩm enzym cellulase theo thời gian bảo quản

2.2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính cellulase bằng phương pháp điện di

2.2.2.5. Phương pháp xác định hoạt tính tương đối thủy phân bã agar

2.2.3 Phương pháp nuôi cấy và đánh giá hoạt tính sinh cellulase của vi sinh vật

2.2.3.1. Các phương pháp nuôi vi sinh vật

2.2.3.2. Đánh giá sinh trưởng của vi khuẩn

2.2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh cellulase của vi sinh vật

2.2.3.4. Phương pháp xác định pH tối ưu của enzym cellulase

2.2.3.5. Phương pháp xác định nhiệt độ tối ưu của enzym cellulase

2.2.3.6. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn B505 và Li đã lựa chọn

Lựa chọn môi trường nuôi cấy: tiến hành xác định khả năng sinh trưởng và tiết enzyme cellulase ngoại bào của 2 chủng Li và B505 trên một số loại cơ chất. Xác định thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, pH nuôi cấy tối ưu cho khả năng sinh trưởng và tiết cellulase ngoại bào của vi khuẩn.

2.2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.4.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm tổng quát

2.2.4.2. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân bã thải rong bằng enzym cellulase

2.4.4.3. Bố trí thí nghiệm thử nghiệm sử dụng chế phẩm thủy phân bã thải rong trong thức ăn nuôi cá rô phi

2.2.4.3. Phương pháp xây dựng khẩu phần công thức thức ăn

2.2.4.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm thử nghiệm thức ăn bổ sung bã rong thủy phân trong nuôi cá rô phi.

2.2.4.5. Phương pháp xác định các thông số nuôi cá rô phi

2.3. Hóa chất và thiết bị

2.3.1. Hóa chất

Carboxymethyl cellulose (CMC), Glucose, Pepton, cao thịt, tinh bột, cao nấm men, cao malt, $MgSO_4$, $CaCl_2$, K_2HPO_4 , $NaHCO_3$, $NaCl$,..... các hóa chất nhập ngoại của các hãng có uy tín trên thế giới như Sigma, Merk, Bio-Canada,...

2.3.2. Thiết bị

Các thiết bị chủ yếu bao gồm: Tủ ủ, Tủ sấy, Thiết bị thủy phân có khuấy đảo, Máy ly tâm, Cân, Máy đo pH, Máy quang phổ UV vis, máy xay, máy nghiền, máy ép viên thức ăn,

Các thí nghiệm nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Phòng Nghiên cứu công nghệ Sau thu hoạch - Viện Nghiên cứu Hải sản và Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia về Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ Sinh học, đã có sẵn các thiết bị, máy móc hiện đại, có độ chính xác cao của đảm bảo cho việc thực hiện đề tài.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích thống kê số liệu sẽ sử dụng tiêu chuẩn t-test, xử lý số liệu tối ưu bằng phần mềm Design Expert version 6.0 (DX6), các phần mềm Excell và K-graph sẽ được sử dụng để phân tích và vẽ đồ thị. [1], [4].

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát đánh giá khối lượng và thành phần hóa học cơ bản của bã thải rong câu chỉ vàng sau sản xuất Agar

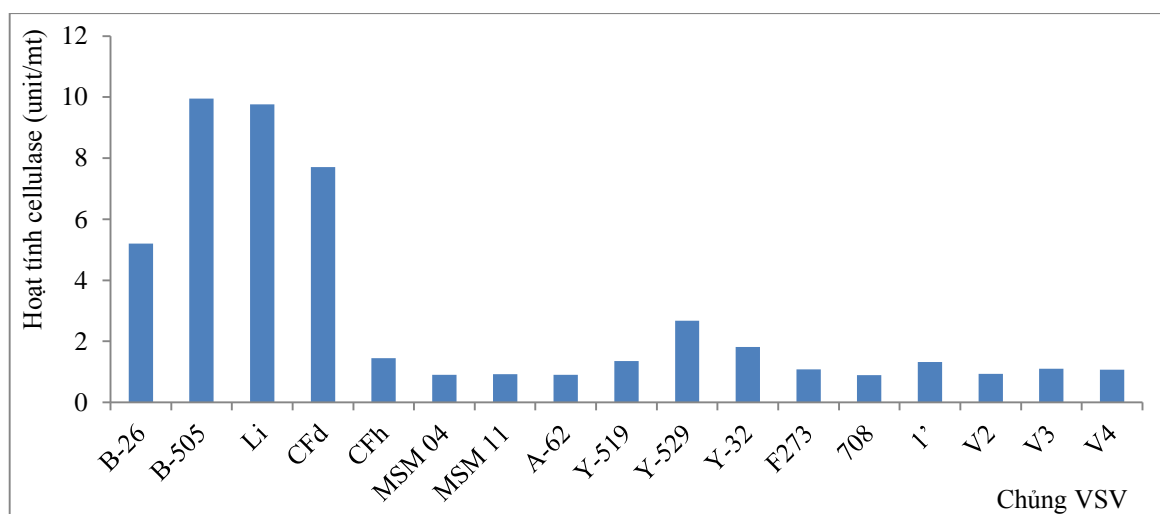
Chất thải rắn sinh ra từ quá trình sản xuất agar rất lớn, trung bình khoảng 9 ÷ 10 tấn phế thải/1TSP, thành phần chính của chất thải này là bã thải rong cellulose. Nhưng do nguồn nguyên liệu ở các vùng khác nhau, do điều kiện khí hậu ảnh hưởng đến chất lượng rong câu chỉ vàng nên cũng ảnh hưởng đến thành phần bã rong.

Qua kết quả phân tích nhận thấy trong thành phần bã rong cho thấy bã thải rong sau sản xuất agar có hàm lượng protein vào khoảng $3,26 \pm 0,11\%$; hàm lượng cellulose vào khoảng $74,26 \pm 4,68\%$; hàm lượng tro khá cao $12,28 \pm 3,77\%$. Kết quả phân tích cho thấy trong bã rong có hàm lượng các nguyên tố khoáng vi lượng rất đầy đủ và hàm lượng các nguyên tố kim loại nặng (As, Pb, Cd, Hg,...) đều dưới mức cho phép dùng trong thực phẩm theo tiêu chuẩn của EU. Ngoài các loại thức ăn truyền thống, thì vai trò của các protein, các vitamin, axit amin và chất khoáng sẽ có ý nghĩa rất lớn đến sự tăng trưởng nhất là yêu cầu chất lượng thương phẩm đang là vấn đề được đặt lên hàng đầu hiện nay. Việc bổ sung từng chất khoáng riêng lẻ gặp rất nhiều khó khăn, phức tạp, những chất khoáng, nhất là khoáng vi lượng chỉ cần một số lượng rất nhỏ nên rất khó định lượng và không chính xác. Nếu thiếu khoáng chất và vitamin bổ sung vào khẩu phần thức ăn, sẽ giảm sức đề kháng đồng thời phát sinh nhiều dịch bệnh. Việc tận dụng bã rong từ sản xuất agar bổ sung vào thức ăn chăn nuôi vừa đảm bảo chất lượng dinh dưỡng vừa mở ra một hướng mới trong tìm nguyên liệu đối với các nhà máy chế biến thức ăn.

3.2. Sàng lọc chủng vi khuẩn sinh enzym cellulase cao

Từ 17 chủng vi sinh vật có khả năng sinh enzym cellulase ngoại bào (6 chủng vi khuẩn, 1 chủng xạ khuẩn, 3 chủng nấm men và 2 chủng nấm sợi và 5 chủng VSV chưa được định tên) đã được Viện Công nghệ Sinh học và trường Đại học Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia khảo sát, đã được tiến hành sàng lọc chúng để tìm ra một vài chủng có khả năng sinh enzym cellulase ngoại bào mạnh nhất. Các vi sinh vật được nuôi trong các môi trường đặc trưng của chúng và bổ sung cơ chất CMC với mục đích làm tăng khả năng tiết enzym cellulase như đã mô tả trong phần phương pháp. Cơ chất CMC là cơ chất tốt nhất để xác định loại enzym Cx. CMC là cơ chất đặc hiệu cho cellulase,

việc sử dụng cơ chất CMC 1% trên đĩa thạch và trong dung dịch phản ứng xác định đầu đường khử bằng dung dịch DNSA là hoàn toàn khẳng định hoạt tính cellulase của các chủng VSV này



Biểu đồ 3.1. Hoạt tính enzyme cellulase của 17 chủng vi sinh vật đã thử nghiệm

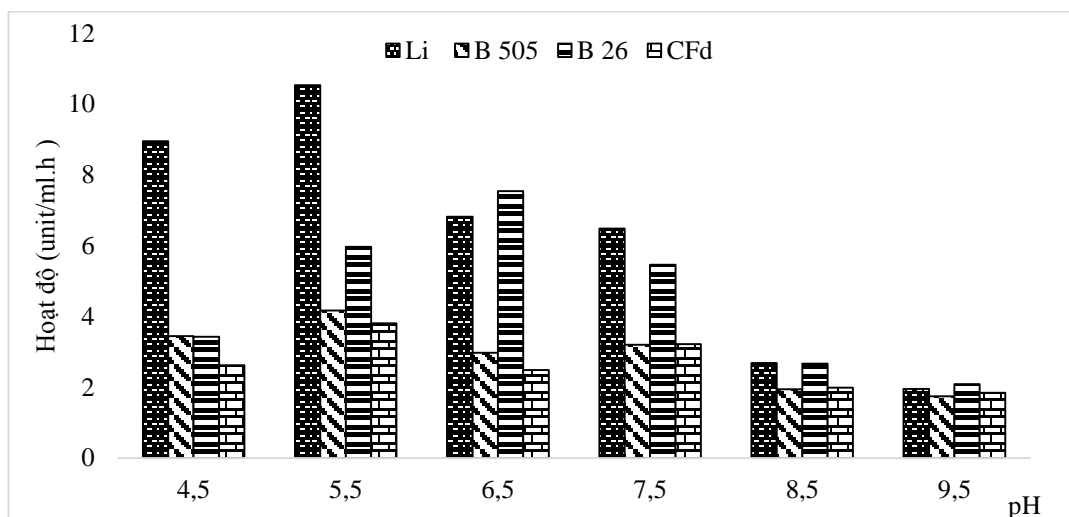
Qua kết quả thí nghiệm thu được 4 chủng Li, B26, B505 và CFd có hoạt tính enzyme cellulase mạnh hơn. Chủng Li và chủng B505 là hai chủng có khả năng tiết cellulase mạnh nhất với hoạt tính lên đến gần 10 unit/ml, cao gấp 6-7 lần các chủng khác. Hoạt độ enzyme được định lượng bằng phương pháp đường khử. Bốn chủng B26, B505, Li và CFd sinh cellulase mạnh thuộc nhóm vi khuẩn, trong đó các chủng B26, B505 và Li thuộc chi *Baccillus* đã được định tên.

Qua kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ enzym cellulase ngoại bào của 4 chủng Li, B26, B505, CFd. Với các điều kiện pH (5,5) và nhiệt độ (50-60°C) tối ưu cho thấy 2 enzym cellulase ngoại bào của chủng Li và B505 có hoạt tính Cx mạnh nhất.

3.2.2. Xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình nuôi cấy vi khuẩn sinh cellulase

3.2.2.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính sinh enzyme cellulase của 4 chủng vi khuẩn (Li, B505, B26 và CFd)

Kết quả đánh ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh cellulase được trình bày ở hình 3.2

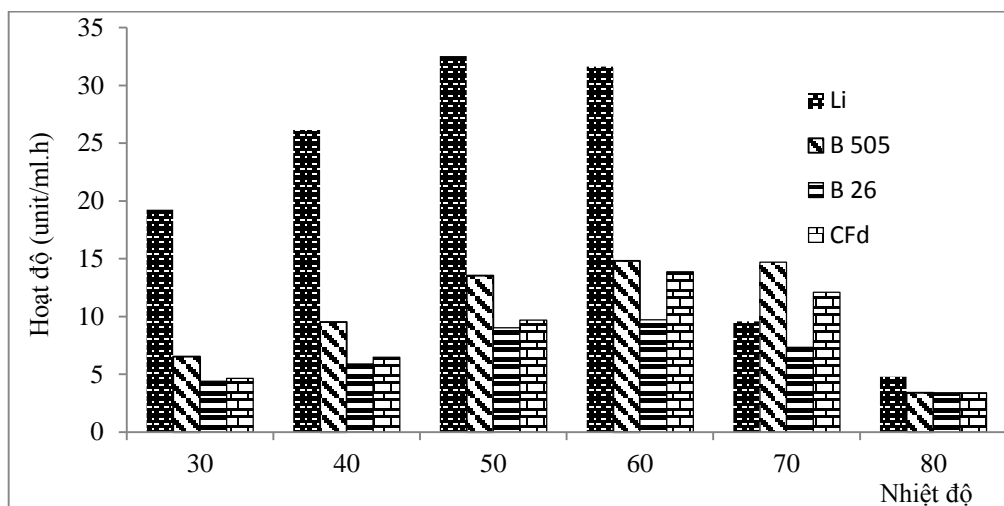


Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của pH lên hoạt độ enzym cellulase ngoại bào của bốn chủng vi khuẩn Li, B26, B505, CFd

Từ các kết quả phân tích ở các hình 2 cho thấy ảnh hưởng của pH lên hoạt độ enzym cellulase của bốn chủng Li, B505, B 26, CFd cho thấy enzyme cellulase ngoại bào của chủng Li, B505 và CFd có hoạt tính cao nhất tại pH 5,5; riêng enzyme cellulase ngoại bào của chủng B26 có hoạt tính cao nhất tại pH 6,5. Như vậy enzyme cellulase ngoại bào của 4 chủng trên hoạt động mạnh trong vùng pH trung tính (pH = 5,5÷ 6,5).

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính sinh enzyme cellulase của 4 chủng vi khuẩn (Li, B505, B26 và CFd)

Trên hình 3.3 cho thấy enzyme cellulase ngoại bào của chủng Li có hoạt tính cao nhất tại nhiệt độ 50°C, enzyme cellulase ngoại bào của chủng B505, B26 và CFd có hoạt tính cao nhất tại nhiệt độ 60°C. Các enzyme cellulase ngoại bào của 4 chủng vi sinh vật mà chúng tôi sàng lọc được hoạt động mạnh trong vùng nhiệt độ từ 50-60°C, đây là vùng nhiệt độ rất thích hợp cho quá trình xử lý bã agar vì nhiệt độ này không làm mất hoạt tính các khoáng đa, vi lượng, protein và acid amin có trong thành phần bã rong để sử dụng làm thức ăn gia súc.



Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ enzym cellulase ngoại bào của 4 chủng Li, B26, B505, CFd

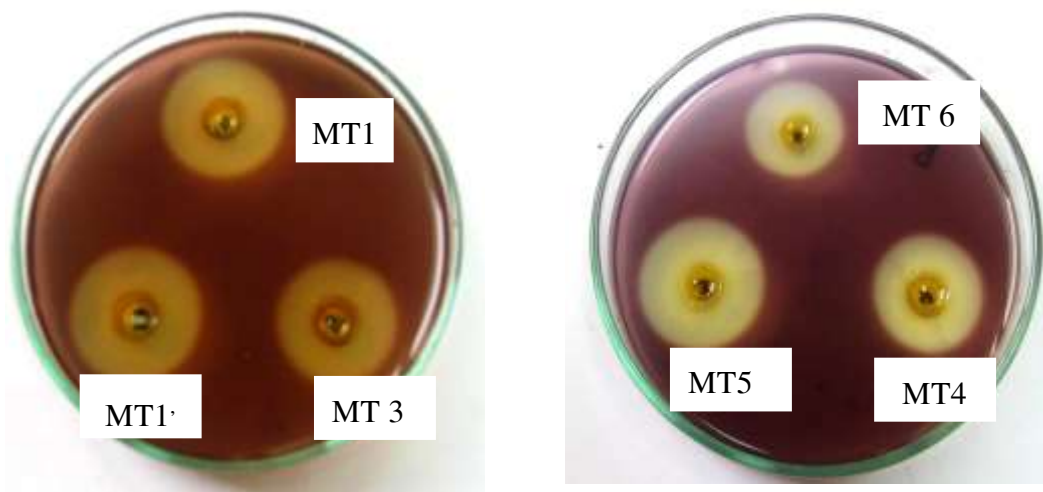
Qua kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ enzym cellulase ngoại bào của 4 chủng: *Bacillus licheniformis* (Li), *Bacillus subtilis* VTCC-B-505, *Bacillus subtilis* VTCC-B-26 và CFd). Với các điều kiện pH (5,5) và nhiệt độ (50-60°C) tối ưu cho thấy 2 enzym cellulase ngoại bào của chủng Li và B505 có hoạt tính Cx mạnh nhất.

3.3. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm enzym cellulase thô từ vi khuẩn *B. subtilis* VTCC B-505 và *B. Licheniformis* (Li) và ứng dụng thủy phân bã rong câu (*G. Verrucosa*) sau sản xuất Agar

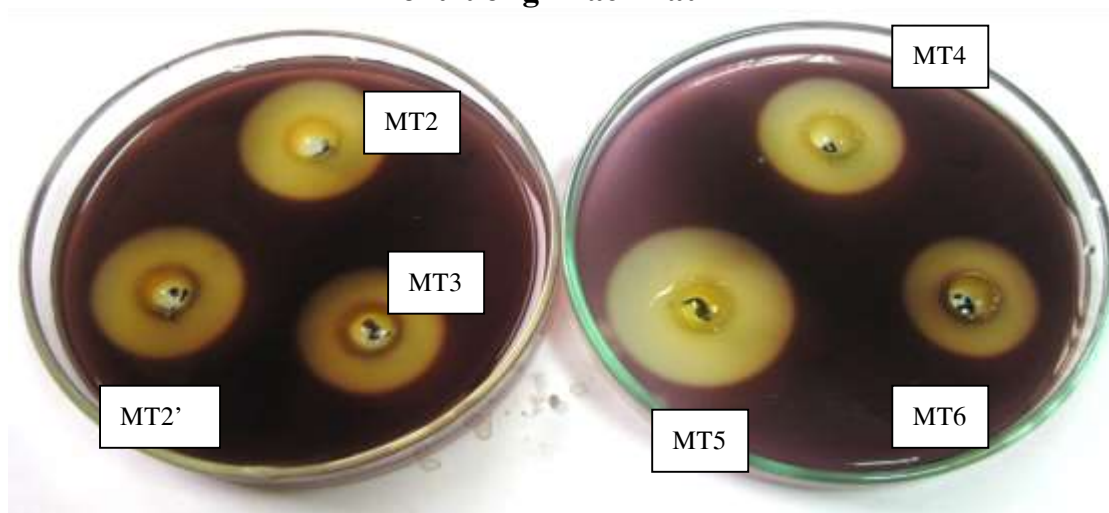
3.3.1. Xác định điều kiện thích hợp cho quá trình nuôi sản xuất enzyme cellulase từ 2 chủng B505 và Li

3.3.1.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

Tiến hành 2 lô thí nghiệm mỗi lô 6 thí nghiệm nuôi cấy vi khuẩn sinh cellulase trên các môi trường nuôi cấy khác nhau: bột đậu tương, bột gạo, nước mắm, môi trường giàu chất khoáng và so sánh với môi trường quy mô phòng thí nghiệm (môi trường MT1, MT1', MT2, MT2', MT3, MT4, MT5, MT6). Sau khi nuôi cấy đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulose bằng phương pháp đo mật độ quang học (OD) của dịch nuôi cấy trên máy so màu quang phổ ở bước sóng 620 nm. Và xác định hoạt tính cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch có cơ chất CMC. 0,2 ml dịch enzyme thô nhỏ vào các giếng thạch có đường kính 10mm, ủ ở 30°C, sau 24 giờ tráng lên đĩa dịch lugol, đo vòng phân hủy trong suốt không bắt màu thuốc nhuộm xung quanh giếng thạch.



Hình 3.4. Hình ảnh về vòng thủy phân của cellulase từ chủng B505 nuôi trong các môi trường khác nhau



Hình 3.5. Hình ảnh về vòng thủy phân của cellulase từ chủng vi khuẩn Li nuôi trong các môi trường khác nhau:

+ Về hoạt tính cellulase của chủng *B. subtilis* VTCC-B-505: Kết quả hình 4 cho thấy, ở điều kiện dinh dưỡng trong môi trường MT1' và MT5 chủng B505 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase cao nhất có đường kính vòng thủy phân là 0,9 cm cao gấp 1,02 lần so với MT1; cao gấp 1,125 lần so với MT3; 1,37 lần so với MT4 và cao gấp 1,153 lần so với MT6. Môi trường nuôi cấy nuôi cấy vi khuẩn hỗn hợp của nhiều thành phần có thể đáp ứng yêu cầu về dưỡng chất như nguồn C, nguồn N, vitamin, khoáng. Môi trường **MT1'** (CMC 2g; CaCl₂ 0,2g; NaCl 2g; Cao thịt 1g, nước cất 1lit) có nguồn C và nguồn N từ môi trường tổng hợp nên giá thành cao. Còn môi trường nuôi cấy **MT5**: (CMC 2g; bột đậu tương 2g, bột gạo 2g; NH₄Cl 0,4g, KH₂PO₄ 0,6g; K₂HPO₄ 1g; nước cất 1lit) có nguồn C và nguồn N từ môi trường tự nhiên là bột đậu tương, bột gạo và có giá thành rẻ hơn. Do đó để sản xuất quy mô lớn, môi trường nuôi cấy **MT5**:

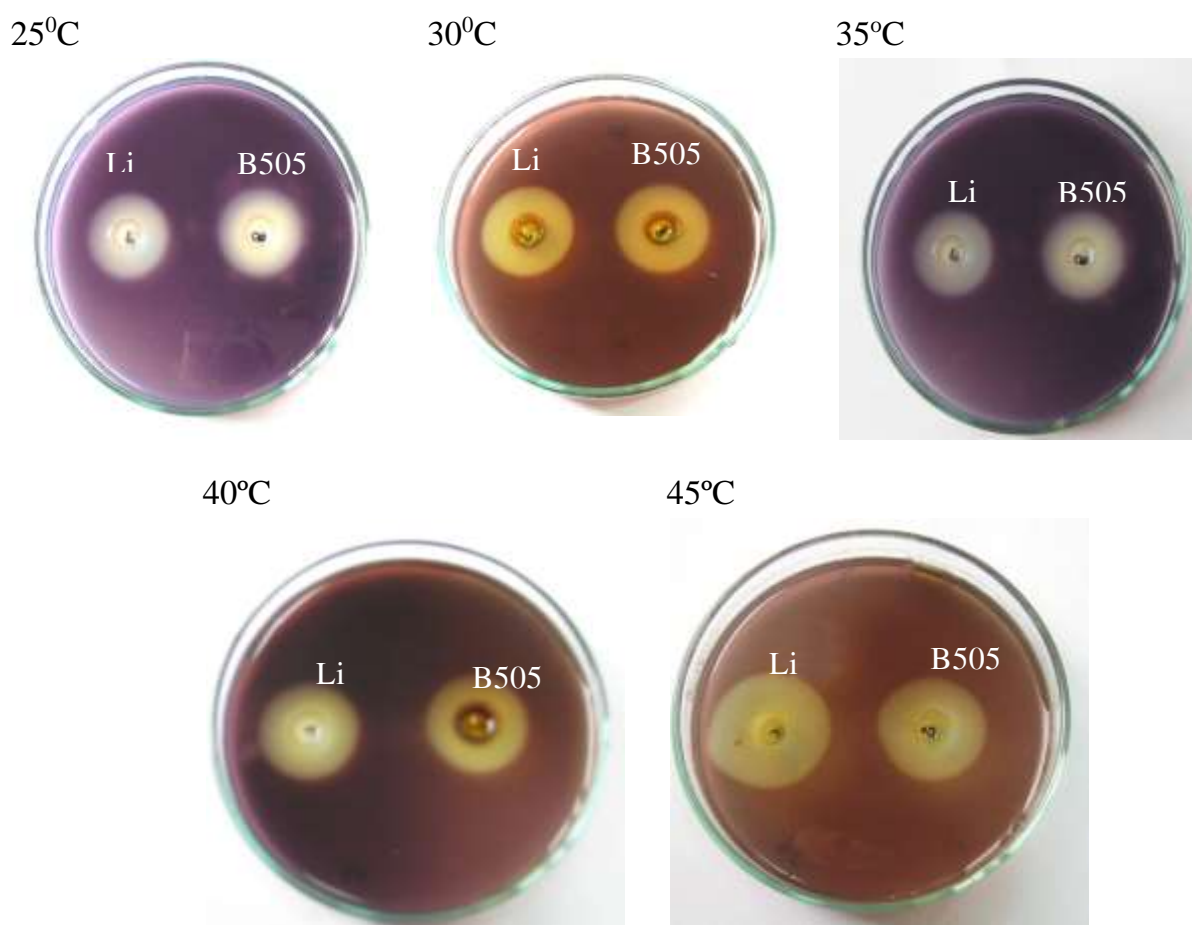
(CMC 2g; bột đậu tương 2g, bột gạo 2g; NH_4Cl 0,4g, KH_2PO_4 0,6g; K_2HPO_4 1g; nước cất 1lit) là môi trường kinh tế hơn môi trường **MT1'**.

+ **Về hoạt tính cellulase của chủng *B. lichenformis* (Li):** Kết quả nghiên cứu trình bày ở hình 5 cho thấy ở điều kiện dinh dưỡng trong môi trường **MT5** (CMC 2g; bột đậu tương 2g, bột gạo 2g; NH_4Cl 0,4g, KH_2PO_4 0,6g; K_2HPO_4 1g; nước cất 1lit) chủng Li có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase cao nhất có đường kính vòng thủy phân là 1,12 cm cao gấp 1,24 lần so với MT2; cao gấp 1,27 lần so với MT2' và MT4, ; và cao gấp 1,33 lần so với MT3 và MT6.

Như vậy môi trường **MT5** là môi trường thích hợp cho cả hai chủng Li và B505, trên cơ sở đó đề tài đã tiến hành xác định các điều kiện nuôi cấy tối ưu của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-505 và *Bacillus lichenformis* (Li).

3.3.1.2.Xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Vì vậy thí nghiệm tiến hành khảo sát khả năng sinh trưởng và tiết cellulase ngoại bào của 2 chủng B505 và Li ở nhiệt độ 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C.

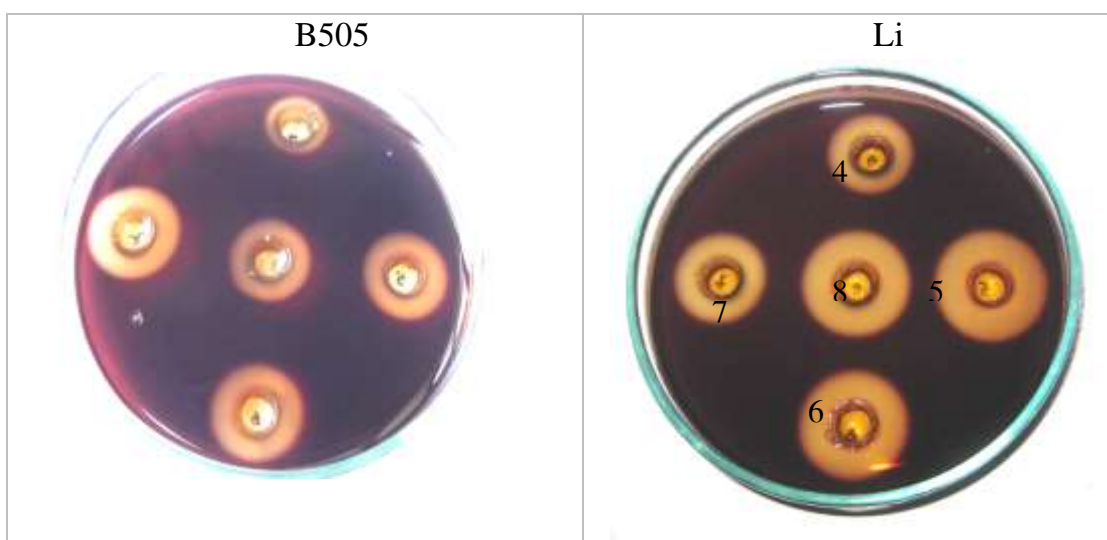


Hình 3.6. Khả năng sinh trưởng và vòng hoạt tính của chủng B505 và chủng Li tại các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ của môi trường cũng có ảnh hưởng rất lớn đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Trên thực tế, do vi sinh vật thường là các sinh vật đơn bào cho nên chúng rất mẫn cảm với sự biến đổi của nhiệt độ, và thường bị biến đổi cùng với sự biến đổi về nhiệt độ của môi trường. Từ các phân tích ở trên cho thấy, nhiệt độ thích hợp cho chủng B505 sinh trưởng và tiết cellulase là 30°C và nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn Li sinh trưởng phát triển, sinh cellulase 45°C .

3.3.1.3. Xác định pH nuôi cấy tối ưu

pH cũng là một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Vì vậy chúng tôi nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và tiết cellulase ngoại bào



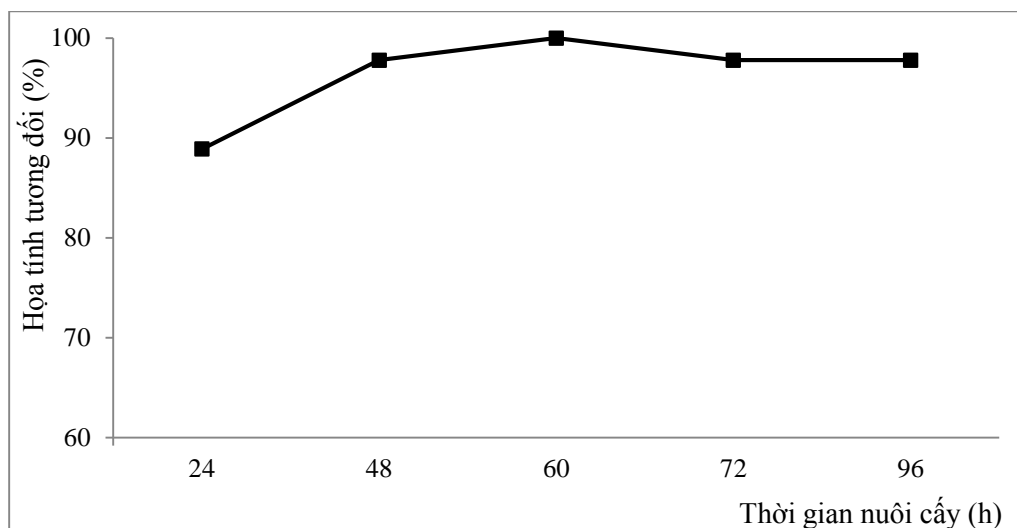
Hình 3.7. Vòng hoạt tính cellulase của chủng B505 và chủng Li nuôi cấy ở các pH khác nhau

pH có ảnh hưởng rõ rệt đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Mỗi vi sinh vật đều có một phạm vi pH sinh trưởng nhất định và pH sinh trưởng tốt nhất. Phần lớn vi khuẩn và động vật nguyên sinh là ưa trung tính là pH 5,5-8,0. Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy khả năng tiết cellulase ngoại bào của chủng B505 và chủng Li cũng chịu ảnh hưởng của các nồng độ pH khác nhau một cách rõ rệt. Chủng B505 nuôi ở môi trường pH = 7 tiết cellulase mạnh nhất trong khi đó chủng Li tiết cellulase mạnh nhất khi nuôi trong môi trường có pH= 5.

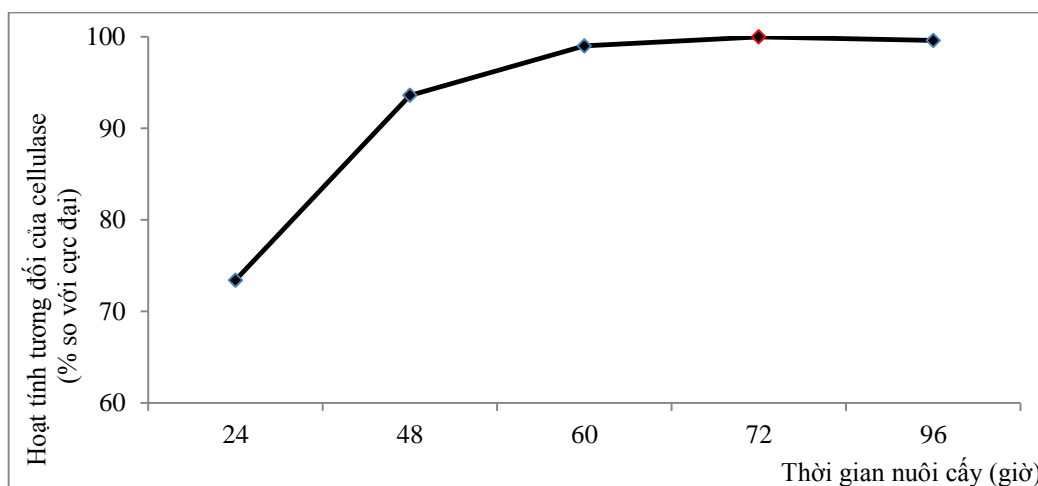
3.3.1.4. Thời gian nuôi cấy tối ưu

Thời gian nuôi cấy cũng là một trong những nhân tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và khả năng sinh enzyme của các chủng vi khuẩn. Trong quá trình nuôi cấy và xác định

hoạt tính của *B. subtilis* VTCC-B-505 và *B. lichenformis* (Li) được theo dõi ở các mốc thời gian.



Biểu đồ 3.8. Hoạt tính cellulase ngoại bào của chủng Li theo thời gian nuôi cấy

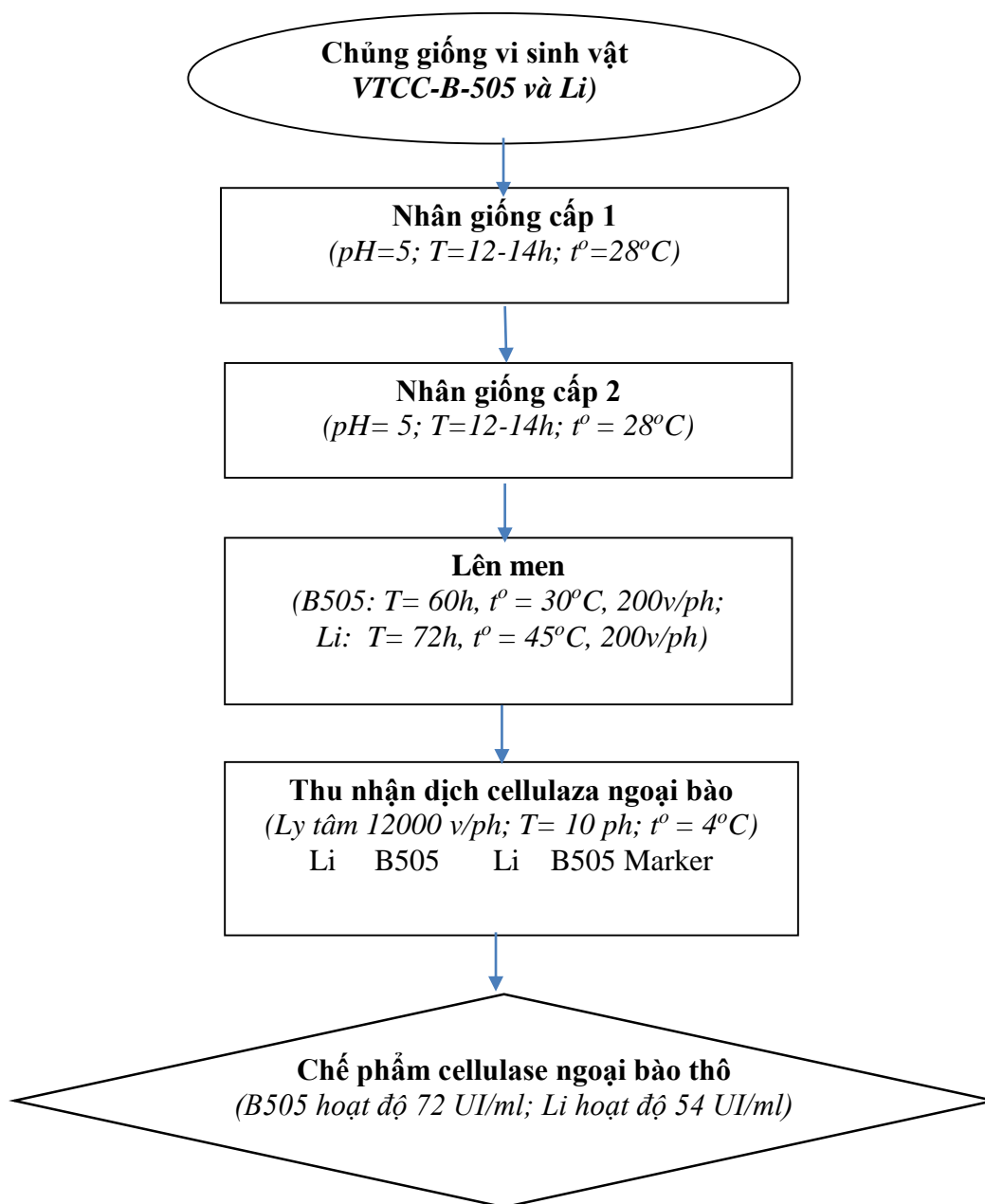


Biểu đồ 3.9. Sự thay đổi hoạt tính cellulase của chủng B505 theo thời gian nuôi cấy

Từ các kết quả phân tích ở các hình 3.8 và hình 3.9 cho thấy chủng Li sau 60 giờ nuôi cấy tiết cellulase ngoại bào mạnh nhất và sau 60 giờ nuôi cấy chủng B505, enzym CMCase ngoại bào thô thu được có hoạt tính đạt 99 % so với hoạt tính enzym CMCase ngoại bào thu được tại 72 giờ nuôi cấy. Như vậy 60 giờ nuôi cấy chủng B505 thu dịch enzyme cho hiệu quả kinh tế cao nhất, tiết kiệm được giá thành sản xuất.

Các kết quả nghiên cứu ghi nhận được như sau: các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng và sinh cellulase có hoạt tính của 2 chủng vi khuẩn Bacillus subtilis VTCC-B-505 và Bacillus lichenformis (Li), môi trường MT5; pH 5-7; nhiệt độ 30 – 45⁰C, thời gian 60 phút.

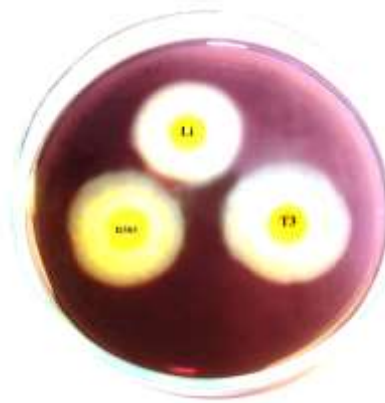
3.3.2. Đề xuất quy trình thu nhận chế phẩm cellulose thô



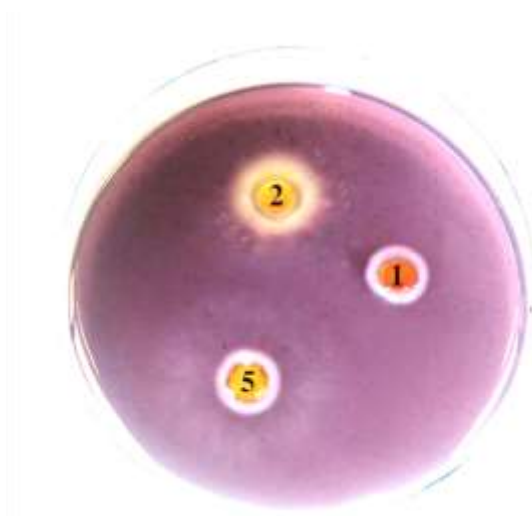
Sơ đồ 3.10. Quy trình thu nhận chế phẩm cellulase thô

3.3.3. So sánh đánh giá hoạt tính cellulose của chủng Li và B505 với chế phẩm cellulose từ các VSV khác

So sánh hoạt tính cellulase ngoại bào của 2 chủng Li và B505 với enzym ngoại bào của 2 chủng nấm *Tricoderma* và *Aspergillus* và enzym cellulase của chủng *Bacillus* T3 do Viện Công nghệ Sinh học cung cấp bằng phương pháp xác định hoạt tính cellulase trên môi trường chứa cơ chất CMC (môi trường tối ưu để phát hiện enzym Cx) và môi trường Cell có bổ sung bột giấy (môi trường tốt cho enzym C1 hoạt động).



Hình 3.11. Đường kính vòng thủy phân của cellulase từ Li, B505 và T3 trên đĩa thạch có cơ chất CMC 0,2%



Hình 3.12. Đường kính vòng thủy phân cellulase từ *Trichoderma* trên đĩa thạch có cơ chất CMC 0,2 %



Hình 3.13. Hoạt tính cellulase *Aspergillus* trên đĩa thạch có cơ chất CMC 0,2 %

Ghi chú: Mẫu 1: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường Cell; Mẫu 2: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường Cell; Mẫu 3: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường Zapek; Mẫu 4: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường Zapek; Mẫu 5: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường riêng cho chúng; Mẫu 6: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường riêng cho chúng.

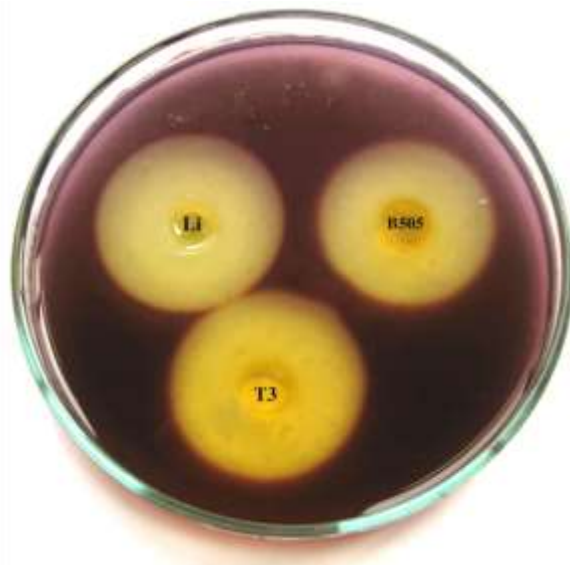


Hình 3.14. Hoạt tính cellulase của 2 chủng nấm *Tricoderma* và *Aspergillus* nuôi ở các môi trường khác nhau trên đĩa thạch có chứa cơ chất bột giấy 0,2 %.

Ghi chú: Mẫu 1: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường Cell; Mẫu 2: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường Cell;

Mẫu 3: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường Zapek; Mẫu 4: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường Zapek;

Mẫu 5: Cellulase từ *T. konigii* nuôi trên môi trường riêng cho chủng; Mẫu 6: Cellulase từ *A. niger* nuôi trên môi trường riêng cho chủng.



Hình 3.15. Hình ảnh về đường kính vòng thủy phân cellulase từ Li, B505 và T3 trên đĩa thạch có cơ chất bột giấy 0,2 %

• Về hoạt tính cellulase của 5 chủng VSV trên đĩa thạch có cơ chất CMC 0,2%

Kết quả hình 3.12 ÷ 3.13 cho thấy 2 chủng nấm *Aspergillus niger*, *Tricoderma konigii* mặc dù được nuôi cấy ở các điều kiện môi trường tối ưu cho nấm nhưng hoạt tính cellulase (Cx) thủy phân cơ chất CMC vẫn yếu hơn 3 chủng vi khuẩn B505, Li và T3. Enzym Cx của chủng B505 có hoạt tính gần tương đương với hoạt tính Cx của chủng T3 (một chủng *Bacillus* sinh cellulase đã được sử dụng trong chế phẩm của Viện Công nghệ Sinh học).Như vậy chủng B505 và chủng Li tiết ra 2 enzym cellulase Cx ngoại bào mạnh hơn rất nhiều so với cellulase ngoại bào của 2 chủng nấm *Tricoderma* và *Aspergillus*.

• Về hoạt tính cellulase của 5 chủng VSV trên đĩa thạch có cơ chất bột giấy 0,2%

Kết quả hình 3.14 ÷ 3.15 cho thấy chủng nấm *Tricoderma konigii* nuôi trên môi trường Zapek cho hoạt tính cellulase ngoại bào thủy phân bột giấy mạnh nhất. Tuy nhiên 2 chủng vi khuẩn B505, Li cũng sinh cellulase ngoại bào thủy phân bột giấy mạnh gần bằng chủng nấm *Tricoderma konigii*. Các số liệu thu được cũng phù hợp với các kết quả của các tác giả khác, cellulase của các chủng nấm thường có hoạt tính C1 cao hơn, trong khi đó hoạt tính Cx thấp hơn cellulase của các chủng vi khuẩn.

Như vậy 3 chủng vi khuẩn T3, B505 và Li là có khả năng thủy phân cơ chất CMC và bột giấy có hiệu quả cao. Việc nuôi cấy vi khuẩn thu chế phẩm enzym thường đơn giản và rẻ tiền hơn so với nuôi cấy các chủng nấm. Trong nhóm vi khuẩn, các chủng thuộc chi *Baccillus* luôn chiếm ưu thế (87%) khi ứng dụng vào xử lý phế thải , bởi các chủng này là những vi khuẩn ưa nhiệt và sinh bào tử nên có khả năng tồn tại và sinh trưởng tốt trong các đồng ủ phế thải có nhiệt độ cao.

Giá thành để sản xuất 1lit chế phẩm enzym thô ở dạng lỏng mà đề tài nghiên cứu cần 40.000 ÷45.000 đồng. Trong khi đó chế phẩm cellulase thô do Công ty Phát triển Sinh học 186 Ngô Gia Tự, Hà Nội sản xuất giá 250.000 đồng/1 lit chế phẩm. Các chế phẩm cellulase nhập ngoại thì giá thành rất cao, không thể sử dụng để thủy phân bã thải agar đại trà.Việc nghiên cứu thu nhận enzym cellulase từ vi sinh vật giúp đề tài có thể chủ động trong khâu thu nhận enzym, giá thành sản xuất lại rẻ hơn so với enzym thương mại được sản xuất trong nước.

Kết quả thu được cho thấy cellulase từ hai chủng B505 và Li có hoạt tính Cx và C1 cao so với cellulase từ các chủng nấm Aspergillus niger, Trichoderma konigii, không kém chủng T3 trong chế phẩm của Viện Công nghệ sinh học. Như vậy có thể sử dụng từng chủng B505 hoặc Li riêng biệt, hay đồng thời cả hai chủng để thu nhận cellulase làm chế phẩm sinh học để thủy phân bã thải agar cho hiệu quả cao. Việc nghiên cứu thu nhận các enzym cellulase có khả năng thủy phân bã thải từ 2 chủng B505 và Li giúp chủ động trong khâu thu nhận enzym, giá thành sản xuất rẻ hơn nhiều so với enzym thương mại được sản xuất trong nước.

3.3.4. Nghiên cứu thủy phân bã thải rong sau sản xuất agar bằng enzym cellulase từ hai chủng vi khuẩn B 505 và Li

3.3.4.1. Tối ưu hóa quá trình thủy phân bã rong bằng cellulase vi khuẩn

Trên cơ sở thí nghiệm thăm dò để chọn vùng ảnh hưởng của các yếu tố (nồng độ enzyme so với cơ chất, thời gian thủy phân, pH, nhiệt độ) đến quá trình thủy phân, tiến hành tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, sử dụng mô hình thiết kế Box-Behnken quá trình thủy phân bã thải agar với các thông số biên như sau: nồng độ enzyme với cơ chất (1 % - 3%), thời gian thủy phân (24 - 48 giờ), nhiệt độ 40 – 60 °C. Cố định các yếu tố: pH 6,5.

Kết quả thí nghiệm cho thấy có mối liên hệ hàm bậc 2 giữa hàm lượng đường tổng số (mg/g) với thời gian thủy phân (giờ), nồng độ Enzyme so với cơ chất (%) và nhiệt độ thủy phân (°C) ($P_{\text{Lack of fit}} = 0,8081$).

$$Y = 2,77 + 0,15 X_1 + 0,21 X_2 + 0,058 X_3 - 1,12 X_1^2 - 0,13 X_2^2 + 0,071 X_3^2 - 0,11 X_1 X_2 + 0,078 X_1 X_3 - 0,068 X_2 X_3$$

Trong đó: Y: hàm lượng đường tổng số (mg/g)

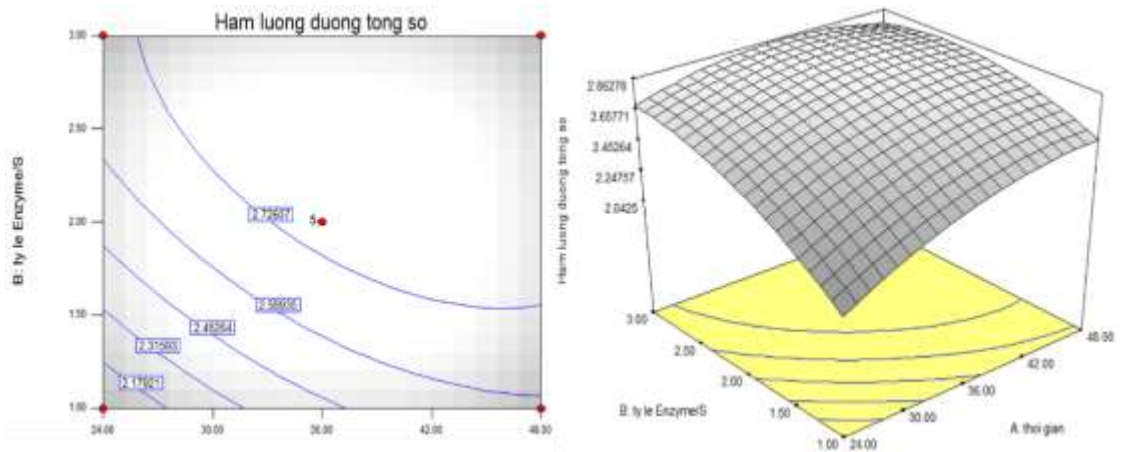
X₁: Thời gian thủy phân (giờ)

X₂: Tỷ lệ hỗn hợp enzyme so với cơ chất (%)

X₃: Nhiệt độ (°C).

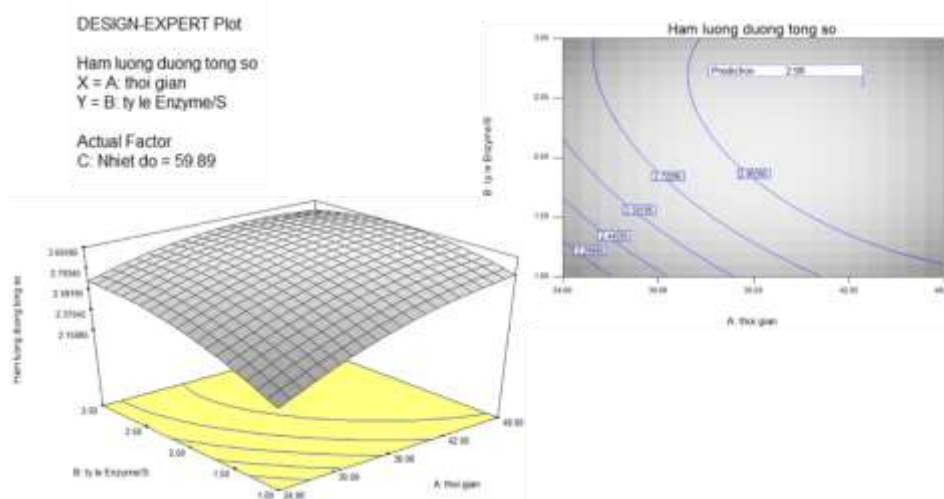
Kết quả xử lý thống kê cho thấy trong khoảng nghiên cứu hai yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng đường tổng số (mg/g) là thời gian thủy phân (p=0.0137) và nồng độ enzyme so với cơ chất (p= 0,0026). Thời gian thủy phân và nồng độ enzyme càng tăng

thì hàm lượng đường tổng số (mg/g) càng tăng. Kết quả xử lý thống kê cũng cho thấy nhiệt độ thủy phân ảnh hưởng không đáng kể đến quá trình thủy phân ($p=0,2538$), hay nói cách khác trong khoảng nhiệt độ nghiên cứu từ 40 – 60 °C việc nhiệt độ thủy phân không làm tăng hàm lượng đường tổng số (mg/g).



Hình 3.16. Đường đồng mức và bề mặt đáp ứng (3D) của hàm lượng đường tổng số (mg/g) theo thời gian thủy phân (giờ) và nồng độ Enzyme so với cơ chất (%).

Kết quả dự đoán vùng tối ưu cho hàm lượng đường tổng số (mg/g) được thể hiện trên hình 3.16. Kết quả chỉ ra một vùng tối ưu và hàm lượng đường tổng số (mg/g) là 2,98 (mg/g).



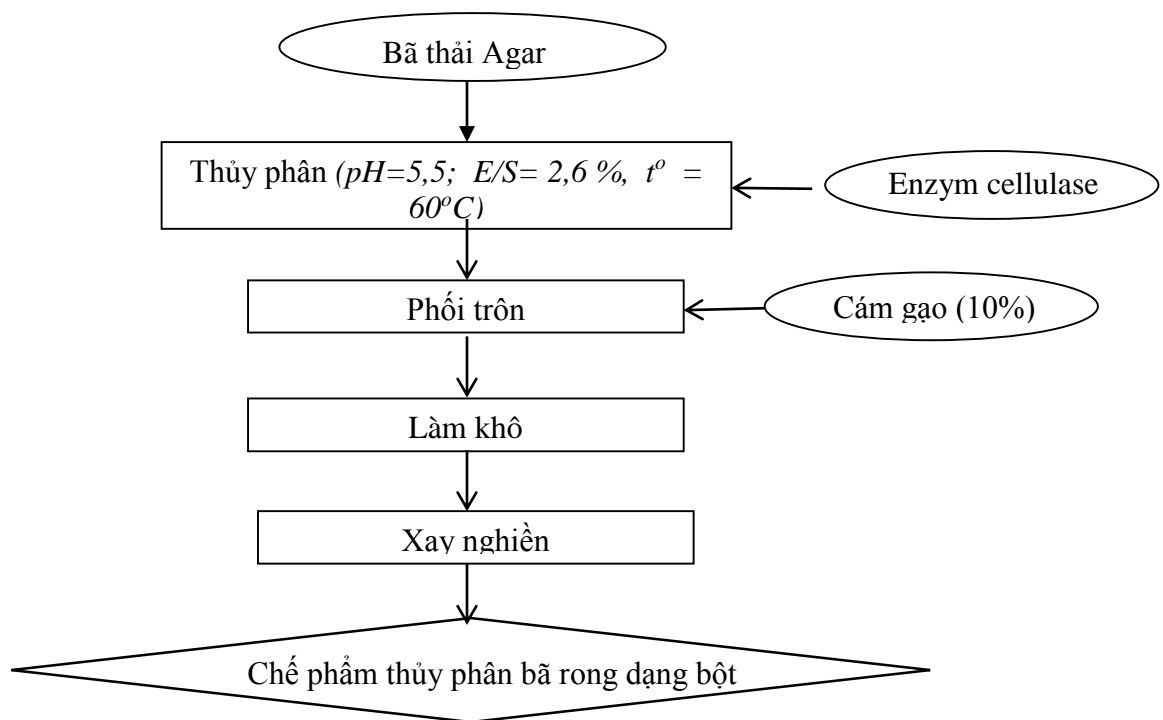
Hình 3.17: Đường đồng mức và bề mặt đáp ứng (3D) tiên đoán hàm lượng đường tổng số (mg/g) tối ưu theo thời gian thủy phân (giờ) và nồng độ Enzyme so với cơ chất (%).

Kết quả kiểm chứng thực nghiệm cho thấy có sự tương thích giữa lý thuyết và thực nghiệm. Hàm lượng đường tổng số $2,68 \pm 0,09$ (%) khi thủy phân bã thải agar bằng chế

phẩm enzym thô ở nhiệt độ 60°C, pH = 5,5 thời gian thủy phân 42 giờ, tỷ lệ hỗn hợp enzym so với cơ chất 2,6 %. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy bã rong mềm, bóp nhẹ thì bã rong nát, màu nâu sáng, mùi tanh của rong. Sản phẩm thủy phân protein thu được từ bã thải agar có thể được sử dụng để phối trộn sản xuất thức ăn chăn nuôi. Từ đó chọn điểm tối ưu là nhiệt độ 60°C, pH = 5,5 thời gian thủy phân 42 giờ, tỷ lệ hỗn hợp enzyme so với cơ chất 2,6 %.

3.3.4.2. Đề xuất quy trình thủy phân bã rong bằng cellulase từ vi khuẩn

Từ các kết quả nghiên cứu trên đề tài rút ra quy trình sản xuất chế phẩm thủy phân bã rong dạng bột như sau:



Hình 3.18. Quy trình thủy phân bã rong bằng cellulase từ vi khuẩn

3.4. THỬ NGHIỆM SỬ DỤNG CHẾ PHẨM THUY PHÂN BÃ THẢI RONG TRONG THỨC ĂN NUÔI CÁ RÔ PHI

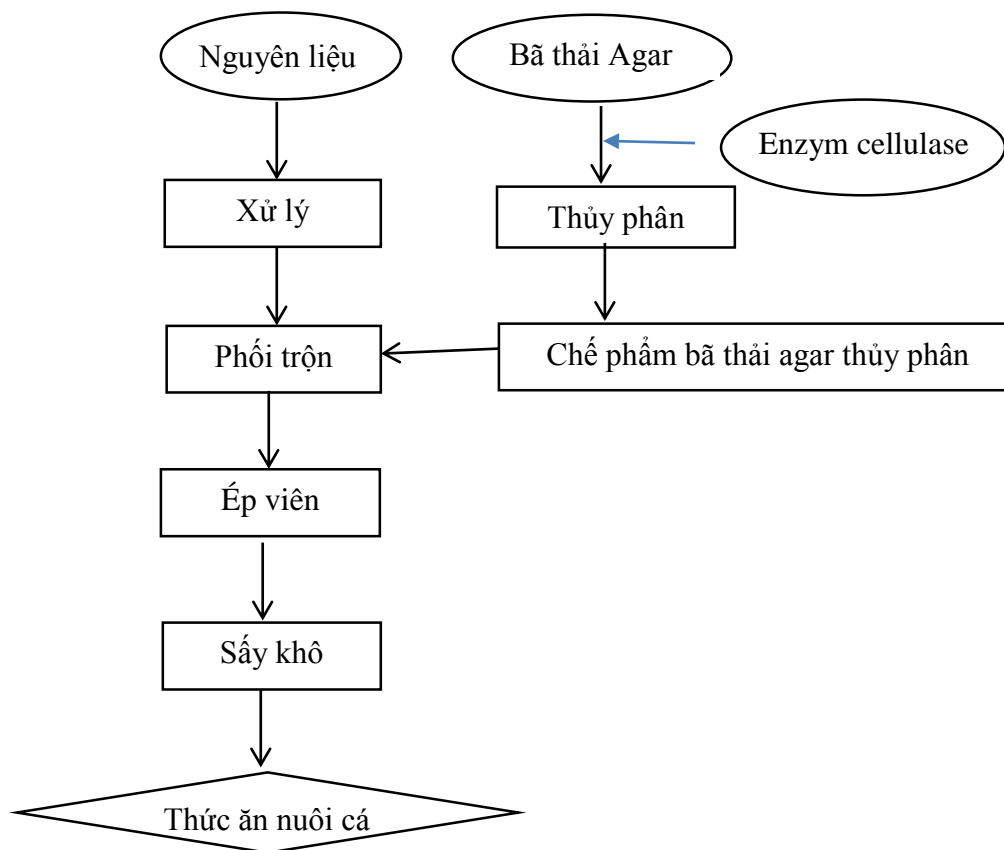
3.4.1. Xây dựng công thức thức ăn nuôi cá rô phi

Dựa vào đặc điểm sinh học và nhu cầu dinh dưỡng theo từng giai đoạn phát triển của cá rô phi, dựa vào nhu cầu protein và lipit làm chuẩn để thay đổi công thức thích hợp, tính toán các tỷ lệ cho phù hợp để đáp ứng nhu cầu năng lượng và protein cho thức ăn nuôi cá rô phi.

Từ lựa chọn nguyên liệu trên, tiến hành xác định thành phần hóa học của các loại nguyên liệu phối trộn và dùng phần mềm **WUFFF DA** tính toán thành phần dinh dưỡng của công thức phối trộn thức ăn cá rô phi.

3.4. 2. Đề xuất quy trình sản xuất thức ăn nuôi cá rô phi

Sơ đồ quy trình



Hình 3.19. Quy trình sản xuất thức ăn nuôi cá rô phi

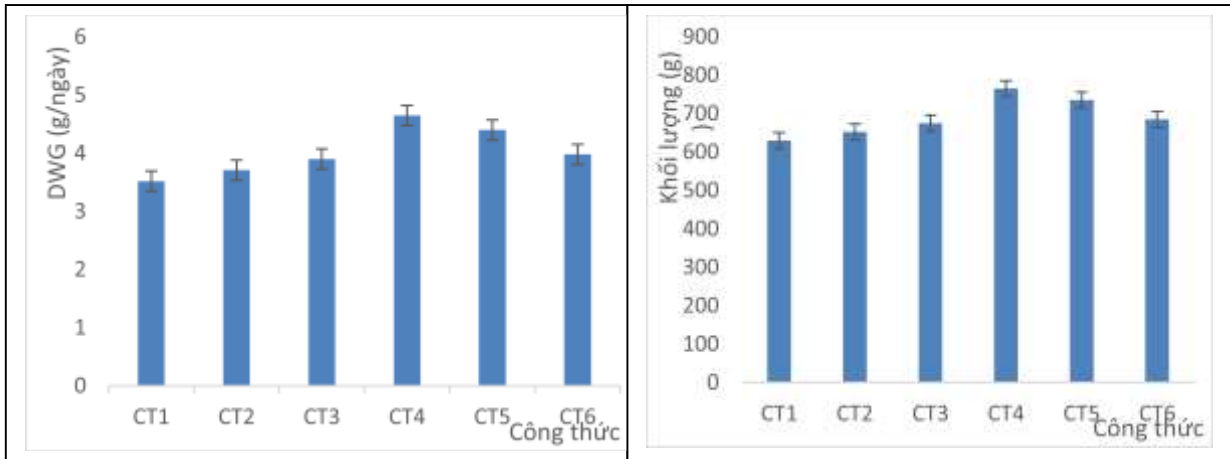
3.4.3. Kết quả nuôi thử nghiệm cá rô phi

3.4.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của công thức thức ăn đến sinh trưởng của cá rô phi

Nghiên cứu ảnh hưởng của protein đến sự sinh trưởng của cá rô phi được tiến hành thử nghiệm. Cá rô phi được nuôi trong 18 giai có kích thước (3m x 2m x 1 m) bằng 6 loại thức ăn thí nghiệm có bổ sung bã agar thủy phân với tỷ lệ phối trộn lần lượt là 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% có hàm lượng protein 25% tương ứng với 6 nghiệm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Số đơn vị thí nghiệm tương ứng là 18 đơn vị thí nghiệm (18 giai nuôi). Mật độ nuôi là 4 con/m². Khối lượng trung bình cá khi bắt đầu thí nghiệm là 205,9 ± 4,3 g/con. Cá được cho ăn hàng ngày 2 lần vào 8h sáng và 16h và được cho ăn trong suốt thời gian thí nghiệm. Khẩu phần cho ăn hàng ngày tùy thuộc vào giai đoạn cá: từ 40 – 100g/con là 5% khối lượng thân, 100 – 150g/con là 4% khối lượng thân giai đoạn

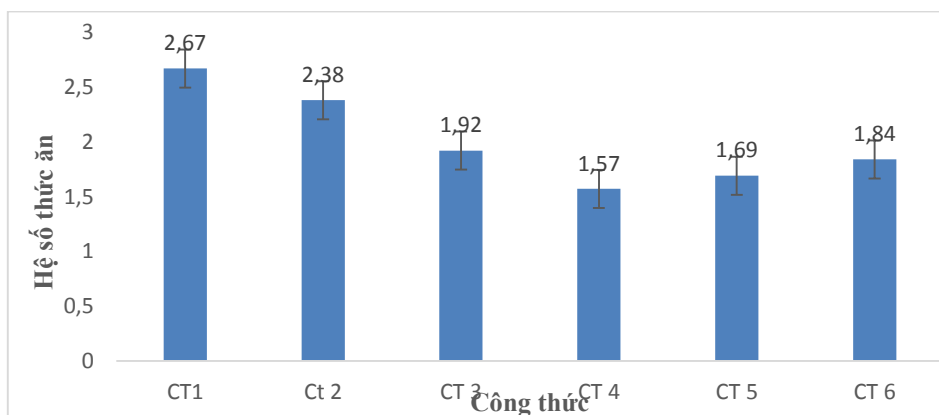
từ 150 – 200g/con là 3% khối lượng thân. *Khẩu phần cho ăn được điều chỉnh theo tăng trưởng của cá bằng cách bắt ngẫu nhiên 10 cá thể cá đem cân sau 20 ngày nuôi để có khối lượng trung bình làm cơ sở ước tính lượng cá trong các nghiệm thức thí nghiệm*

Tốc độ sinh trưởng khối lượng của cá thí nghiệm sau 80 ngày nuôi được trình bày trong Hình 3.19 ÷ 3.20.



Hình 3.20. Tốc độ sinh trưởng (g/con) và DWG (g/ngày) của cá rô phi với thức ăn phối trộn bã rong thủy phân khác nhau sau 80 ngày nuôi.

Qua kết quả hình 3.19 cho thấy khối lượng cá ở cả sáu công thức đều có sự tăng lên về khối lượng. Khối lượng trung bình ở các giai đoạn thử nghiệm từ 652 đến 765 g. Công thức thức ăn có hàm lượng protein là 25% với tỷ lệ phối trộn bã rong thủy phân là 15%/ khối lượng có sự tăng trọng tốt nhất với trọng lượng cao nhất là $765 \pm 4,2$ (g và tốc độ tăng trưởng cao nhất là $4,65 \pm 0,03$ (g/ngày). Thức ăn có hàm lượng protein là 25% (Pr25) với công thức đối chứng không phối trộn bã rong thủy phân có tốc độ tăng trưởng thấp hơn trong suốt quá trình nuôi thí nghiệm, trung bình tăng trưởng là $3,52 \pm 0,04$ (g/ngày).



Hình 3.21. Hệ số chuyển đổi thức ăn của nuôi thử nghiệm các công thức thức ăn

Tỷ lệ sống và hệ số thức ăn của cá sau thời gian nuôi thử nghiệm ở nghiệm thức đối chứng (CT1) không có phối trộn bã rong thủy phân lần lượt là 76,4 % và 2,67. Trong

khi đó các nghiệm thức bằng thức ăn có phối trộn thêm bã rong thủy phân thì có hệ số thức ăn từ 1,57 đến 2,4 và tỷ lệ sống từ 80,6% - 88,5%. Nếu so sánh với một số kết quả nuôi của các tác giả đã công bố thì tỷ lệ sống này cao hơn nhiều.

Kết quả thử nghiệm nuôi cá rô phi bằng công thức thức ăn CT4 và CT5 cho thấy công thức thức ăn CT4 và CT5 cho kết quả nuôi tốt hơn các công thức khác là do: trong quá trình thủy phân bã thải rong bằng enzyme cellulase, các polyme như cellulose, hemicellulose,.. sẽ bị thủy phân thành các đơn phân như đường glucose, các loại đường đơn thường dễ được hấp thu qua thành ruột. Mặt khác, trong chế phẩm thủy phân từ bã thải rong còn chứa các khoáng chất, nguyên tố vi lượng và các chất khác từ bã thải rong. Do vậy, thức ăn nuôi cá rô phi có bổ sung chế phẩm thủy phân từ bã thải rong, sẽ cung cấp đủ khoáng chất, các nguyên tố vi lượng có nguồn gốc từ biển hơn các thức ăn bình thường. Mặt khác loại thức ăn nuôi cá rô phi có bổ sung chế phẩm thủy phân từ bã thải rong lại chứa các chất thủy phân dạng đơn phân (ví dụ glucose) nên dễ hấp thụ. Do vậy, khi nuôi cá rô phi bằng thức ăn có bổ sung chế phẩm thủy phân từ bã thải rong, cá lớn nhanh hơn, hệ số thức ăn sẽ thấp hơn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép rút ra một số kết luận sau:

1) Kết quả khảo sát đánh giá về bã thải rong sau sản xuất agar của một số doanh nghiệp sản xuất agar từ rong câu tại Hải Phòng và một số địa phương khác cho thấy hàng năm các doanh nghiệp sản xuất agar tại Hải Phòng thải ra trên 3.500 tấn bã thải rong có thành phần như sau: hàm lượng protein $3,26 \pm 0,11\%$; hàm lượng cellulose $74,26 \pm 4,68\%$; hàm lượng tro $12,28 \pm 3,77\%$ và có hàm lượng kim loại nặng dưới mức cho phép của Bộ Y tế.

2) Đã tiến hành nghiên cứu, sàng lọc khả năng sinh enzyme cellulase của 17 chủng vi sinh vật trong sưu tập giống vi sinh vật của Viện Công nghệ Sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội và lựa chọn được 2 chủng: *B. subtilis* VTCC-B-505 (B505) và *B. licheniformis* (Li) có hoạt tính sinh cellulase cao.

3) Khi nuôi cấy ở các điều kiện tối ưu để 2 chủng vi khuẩn *B. subtilis* VTCC-B-505 và *B. licheniformis* (Li) sinh enzyme cellulase với hoạt tính cao: môi trường MT5 (CMC 2g; bột đậu tương 2g, bột gạo 2g; NH_4Cl 0,4g, KH_2PO_4 0,6g; K_2HPO_4 1g; nước cất 1lit); pH 5-7; nhiệt độ 30 – 45°C, thời gian 60 phút, hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* VTCC-B-505 và *B. licheniformis* Li có khả năng sinh cellulase với nồng độ rất cao, tương ứng là 72UI/ml và 54 UI/ml.

4) Xác định được một số điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân bã rong câu sau sản xuất agar bằng chế phẩm cellulase từ 2 chủng vi khuẩn (*B. subtilis* VTCC B505 và *B. licheniformis* Li): nhiệt độ thích hợp 60°C, pH thích hợp 5,5, thời gian thủy phân tối ưu 42 giờ, tỷ lệ hỗn hợp enzyme so với cơ chất 2,6 %. Sản phẩm thủy phân bã thải agar dạng bột có độ mịn và tơi, mùi đặc trưng của rong biển khô có hàm lượng protein 4,55 %, xơ thô 23,12%, độ ẩm 12,97 %.

5) Bước đầu có thể khẳng định rằng bã thải rong câu được xử lý thích hợp bằng chế phẩm enzyme cellulase từ vi khuẩn có thể sử dụng để bổ sung (khoảng 15%) vào thành phần thức ăn nuôi cá rô phi đơn tính, mang lại hiệu quả về kinh tế cao (tỷ lệ cá sống

cao trên 80 %, hệ số thức ăn thấp 1,57 - 1,94), đồng thời góp phần xử lý chất thải làm sạch môi trường.

2. KIẾN NGHỊ

Từ những nghiên cứu ở trên cho phép đề xuất kiến nghị:

1) Tiến hành sản xuất cellulase từ 2 chủng *B. subtilis* VTCC-B-505 (B505) và *B. lichenformis* (Li) ở qui mô lớn để thu chế phẩm enzym cellulase dùng trong công nghiệp thủy phân bã rau củ sau sản xuất agar.

2) Thử nghiệm sản xuất thức ăn bổ sung chế phẩm bã thải agar thủy phân theo công thức của Luận án đã đề xuất để triển khai nuôi cá rô phi và một số loài cá nước ngọt ở quy mô công nghiệp.