

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

GS. TS TỪ QUANG HIỀN (Chủ biên)
GS. TS ĐẬU NGỌC HẢO
TS. LÊ THỊ NGỌC DIỆP
TS. TỪ TRUNG KIÊN

ĐỘC TỔ TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI
(Tài liệu sử dụng cho đào tạo bậc tiến sĩ)

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI 2012

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

**GS. TS TỪ QUANG HIỂN (chủ biên)
GS.TS ĐẬU NGỌC HÀO - TS LÊ THỊ NGỌC DIỆP - TS TỪ TRUNG KIÊN**

ĐỘC TỐ TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI

(Tài liệu sử dụng cho đào tạo bậc tiến sĩ)

**NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
Hà Nội - 2012**

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU	5
Chương I. NẤM MỐC VÀ ĐỘC TỔ CỦA NẤM MỐC	7
1.1. Những thông tin cơ bản về nấm mốc và độc tố của nấm mốc	7
1.2. Tác hại của nấm mốc đối với vật nuôi và thức ăn chăn nuôi	13
1.3. Các phương pháp phòng chống nấm mốc	15
Chương II. ĐỘC TỔ AFLATOXIN	25
2.1. Giới thiệu về độc tố aflatoxin	25
2.2. Bệnh nhiễm độc aflatoxin ở vật nuôi (Aflatoxicosis)	26
2.3. Điều kiện để <i>A.flavus</i> phát triển và sản sinh aflatoxin ở ngô hạt	34
2.4. Phương pháp phân tích aflatoxin	37
2.5. Các phương pháp phân hủy aflatoxin	45
2.6. Sử dụng thức ăn chăn nuôi bị nhiễm aflatoxin	52
2.7. Một số chế phẩm chống aflatoxin	56
Chương III. ĐỘC TỔ HCN TRONG SẢN PHẨM SẴN	61
3.1. Giới thiệu về độc tố HCN trong cây sắn	61
3.2. Phương pháp hạn chế và loại bỏ HCN trong sản phẩm sắn	64
3.3. Nghiên cứu, sử dụng sắn trong chăn nuôi	67
Chương IV. ĐỘC TỔ MIMOSIN TRONG KEO GIẬU	73
4.1. Chất độc mimosin trong keo giậu	73
4.2. Mimosin trong cây keo giậu	76
4.3. Phương pháp hạn chế và loại bỏ mimosin trong thức ăn	77
4.4. Các nghiên cứu về sử dụng keo giậu trong chăn nuôi	80

Chương V. ĐỘC TỔ TRONG ĐẬU ĐỎ, KHOAI TÂY VÀ MỘT SỐ CHẤT CÓ THỂ GÂY ĐỘC	85
5.1. Độc tố trong đậu đỏ	85
5.2. Độc tố solanin trong khoai tây	96
5.3. Tác động độc của khoáng	98
5.4. Một số chất gây độc khác	100
TÀI LIỆU THAM KHẢO	103

LỜI NÓI ĐẦU

Theo quy định của Bộ Giáo dục - Đào tạo, từ năm 2012 trở đi, đào tạo trình độ tiến sĩ sẽ thực hiện theo chương trình đào tạo mới. Đó là, nghiên cứu sinh sẽ học một số môn học chuyên sâu của chuyên ngành đào tạo trước khi thực hiện đề tài khoa học. Để đáp ứng yêu cầu này, chúng tôi đã biên soạn giáo trình “Độc chất trong thức ăn chăn nuôi”, mã số TIF 821 thuộc chuyên ngành Dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi, mã số 62 62 45 01.

Giáo trình cung cấp cho nghiên cứu sinh những thông tin cơ bản nhất về cấu tạo hóa học, cơ chế gây độc và biện pháp phòng ngừa, loại bỏ, phân hủy các độc tố trong các loại thức ăn đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam và trên thế giới.

Giáo trình gồm có 5 chương:

Chương I: Viết về nấm mốc và độc tố của nấm mốc trong các loại thức ăn chăn nuôi. Nấm mốc sinh sản phát triển trên tất cả các loại thức ăn và gây tổn hại tới gần 10% tổng số ngũ cốc và thực phẩm trên toàn cầu.

Chương II: Trình bày sâu hơn về một loại độc tố thường gặp nhất và nguy hại nhất trong số các độc tố của nấm mốc, đó là aflatoxin.

Chương III: Cung cấp một số thông tin về độc tố HCN trong sản phẩm sắn, một loại thức ăn được sử dụng rộng rãi thuộc hàng thứ hai sau ngũ cốc trên toàn thế giới.

Chương IV: Giới thiệu về độc tố mimosin trong keo giậu, một loại cây thức ăn xanh giàu protein, caroten, các chất sắc tố và được sử dụng sản xuất thành bột lá thực vật với sản lượng lớn trên thế giới.

Chương V: Viết về các độc tố trong đậu tương, khoai tây và một số chất có thể gây độc.

Tập thể tác giả xin trân trọng giới thiệu với các thầy cô giáo, sinh viên đại học, học viên cao học, nghiên cứu sinh và độc giả cuốn giáo trình này. Kính mong được sự quan tâm góp ý của các đồng nghiệp, sinh viên, học viên, nghiên cứu sinh và độc giả.

Các tác giả

Chương I

NẤM MỐC VÀ ĐỘC TỐ CỦA NẤM MỐC

1.1. Những thông tin cơ bản về nấm mốc và độc tố của nấm mốc

1.1.1. Giới thiệu về nấm mốc

Nấm mốc là một trong năm hình thái tạo nên sự sống của Trái Đất (thực vật, động vật, nguyên bào, vi khuẩn và nấm mốc). Nó là vi sinh vật có cấu tạo gần giống với thực vật, sống ký sinh hay hoại sinh trên nhiều loại cơ chất khác nhau, đặc biệt là chất hữu cơ.

Người ta đã phát hiện khoảng 200.000 loài nấm mốc khác nhau, trong đó có khoảng 50 loài có hại (gây bệnh và gây ngộ độc cho người và động vật). Có nhiều loài nấm mốc có lợi cho con người nhưng trong phạm vi cuốn sách này, chúng tôi chỉ trình bày về nấm mốc gây độc hại trong thức ăn chăn nuôi.

1.1.2. Sinh sản và phát triển

Nấm có mặt trên khắp thế giới không kể là khu vực nhiệt đới, ôn đới, khí hậu nóng hay lạnh. Chúng có thể phát triển quanh năm, mùa hè, mùa thu, mùa đông hay mùa xuân. Đối tượng dễ nấm mốc ký sinh hay hoại sinh gồm hầu hết mọi thứ vật chất: trên cơ thể động, thực vật, đất, nước, phân, cây mục, đồ dùng, lương thực, thực phẩm, hoa quả, thậm chí trên một số loại vật chất hầu như không có chất dinh dưỡng như dụng cụ quang học, kim loại và các chất dẻo vv... Sự sinh sản của nấm mốc rất đa dạng, gần gũi với thực vật hơn là vi sinh vật, có hai con đường sinh sản và phát triển sau đây:

* Sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là hình thức phổ biến nhất đối với các loại nấm mốc có mặt trên lương thực và thực phẩm cũng như thức ăn chăn nuôi.

Phương thức đơn giản là hình thức bào tử, có hai dạng bào tử là bào tử trần và bào tử kín. Bào tử kín sau giai đoạn chín sẽ vỡ vỏ bọc và giải phóng các bào tử ra ngoài. Bào tử trần được hình thành đơn giản, từ sợi nhánh phát sinh trên sợi mẹ, đầu sợi phình to gọi là bông, trên bông hình thành các thể bình, trên các thể bình hình thành các bào tử trần, xếp thành từng chuỗi. Bào tử trần còn được hình thành trực tiếp trên các sợi nấm phân hóa và được gọi là các tiền bào tử. Các bào tử có dạng nang có thể đơn độc (chồi) hoặc thành chồi bào tử già ở gốc, bào tử non ở ngọn, vì bào tử vừa được hình thành lại có khả năng tạo ra các bào tử mới. Bào tử kín thường ở dạng bọc hay nang bào tử. Trong bọc hay nang có chứa nhiều bào tử khác nhau. Bào tử kín cũng được hình thành từ sợi nấm, đầu nút của sợi được phình lên gọi là trụ và hình thành bào tử trong nang, các bào tử kín sau khi chín được giải phóng ra ngoài. Bào tử nói chung có màng hay gọi là vỏ dày có thể chịu được điều kiện không thuận lợi của môi trường bên ngoài, khi gặp môi trường thuận lợi có thể nảy mầm và phát triển thành khuẩn lạc và lại tiếp tục chu kỳ phát triển.

** Sinh sản hữu tính*

Sinh sản hữu tính là do hai đầu sợi nấm tiếp hợp với nhau mà tạo thành các bào tử tiếp hợp, thường thấy trong các loài *Mucor*.

Bào tử nang được hình thành theo một phương thức phức tạp, từ một sợi nấm sinh sản tạo thành các nang, trong các nang có chứa bào tử, nhiều nang bào tử được bọc trong các túi hình tròn. Khi các nang chín vỡ ra, bào tử được giải phóng ra ngoài gặp điều kiện thuận lợi phát triển thành khuẩn lạc nấm mốc.

1.1.3. Điều kiện môi trường cho sự sinh sản và phát triển của nấm mốc

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng tốt hoặc xấu đến sự sinh sản và phát triển của nấm mốc, trong đó có năm yếu tố chính dưới đây: (1) nước trong cơ chất, (2) nhiệt độ môi trường, (3) ẩm độ môi trường, (4) độ pH môi trường, (5) chất dinh dưỡng trong cơ chất.

** Nước trong cơ chất.*

Hàm lượng nước trong cơ chất (ngô, đậu tương, rau, quả...) được gọi là độ ẩm tương đối của cơ chất (ký hiệu là RH), nó biểu thị sự so sánh khối lượng nước trong cơ chất với khối lượng của cơ chất, đơn vị là phần trăm (%). Ví dụ: tỷ lệ nước (ẩm độ tương đối) của rau muống là 87%, của lá keo giậu là 83%, của ngô hạt là 14%....

Hàm lượng nước trong cơ chất bao gồm hai phần: nước liên kết và nước tự do. Nước liên kết gần như là ổn định trong quá trình phơi hoặc sấy ở nhiệt độ thấp. Nước tự do thì bị thay đổi trong quá trình phơi, sấy; nó bị giảm đi khi phơi hoặc sấy kéo dài ở nhiệt độ thấp và có thể không còn tồn tại (bằng 0) khi sấy ở nhiệt độ cao. Lá cây phơi nắng bị héo, cá phơi nắng bị teo đi, vì nước tự do trong chúng bị bốc hơi vào không khí.

Lượng nước tự do trong cơ chất được ký hiệu là a_w . Lượng nước tự do là một khái niệm về hóa học, nó có mối quan hệ tỷ lệ thuận với sự phát triển của nấm mốc. Lượng nước tự do trong cơ chất càng lớn thì khả năng sinh sản và phát triển của nấm mốc càng cao.

Khi phơi, sấy, hàm lượng nước tự do trong cơ chất giảm xuống thấp; khi càng thấp thì nó càng gắn kết chặt với cơ chất. Vì vậy nấm mốc cũng khó xâm nhập và phát triển trên cơ chất. Đây là lí do tại sao muốn bảo quản nông sản phẩm thì phải phơi, sấy khô.

Việc xác định lượng nước tự do (a_w) trong cơ chất chỉ áp dụng trong nghiên cứu, còn trong thực tế người ta quan tâm đến độ ẩm tương đối của cơ chất hơn. Vì vậy, việc phòng chống nấm mốc tập trung vào khống chế độ ẩm tương đối của cơ chất là chính.

** Nhiệt độ môi trường*

Nhiệt độ môi trường được đánh giá là nhân tố quan trọng thứ hai đối với sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Nấm mốc có thể phát triển được trong phạm vi nhiệt độ rất rộng, từ 0-60°C, có thể chia ra một số nhóm như sau:

Nhóm chịu nhiệt (Thermophile): Nhóm này phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ môi trường khá cao. Trung bình nhiệt độ phát triển là 30-40°C, tối đa là 50°C. Cũng có một vài loài có thể phát triển được ở nhiệt độ 55-60°C (*Mucor pusillus*).

Nhóm ưa nhiệt (Mesophile): Đây là nhóm phát triển tốt trong phạm vi nhiệt độ từ 10-40°C. Thích hợp nhất là 25°C. Phần lớn nhóm này thuộc hai loài là *Aspergillus* và *Penicillium*. Điển hình nhất là *A. versicolor* và *P. chrylogenum*.

Nhóm chịu lạnh (Psychrophile): Có thể phát triển ở phạm vi nhiệt độ từ 7-10°C. Phần lớn nhóm nấm này thuộc loài *Fusarium*, có mặt ở các lục địa có nhiệt độ thấp như châu Âu, phát triển trên mì, mạch qua mùa đông. Một số loài điển hình là *F. conglutinan*, *A. versicolor*, *P. cyclopium*.

** Ẩm độ môi trường*

Nấm mốc có thể phát triển được trong điều kiện ẩm độ môi trường rất thấp hoặc rất cao. Căn cứ vào sự thích ứng của chúng với ẩm độ môi trường người ta chia thành hai nhóm sau:

Loài nấm ưa khô (Xerophile): phát triển được trong phạm vi độ ẩm môi trường 75% - 85%. Phần lớn nấm ưa khô thuộc loài *Aspergillus* và một số thuộc *Penicillium*. Người ta còn gọi là nấm trong bảo quản, điển hình là *Alternaria tenuis*, *Cladosporium cladosporides*, *Trichothercium roseum* v. v...

Loài ưa ẩm cao: Phát triển được ở phạm vi độ ẩm từ 90-100%. Đại diện như *Epicocum nigrum*, *Mucor circinelloides*, *Trichothercium roseum*.

Bảng 1.1: Phạm vi nhiệt độ thích hợp đối với một số loài nấm mốc

Tên nấm mốc	Tối thiểu (°C)	Thích hợp nhất (°C)	Tối đa (°C)
<i>Absidia corymbifera</i>	-	35 - 37	45
<i>Alternaria alternate</i>	-2 - 5	20 - 25	31 - 32
<i>Aspergillus candidus</i>	3 - 4	20 - 24	40 - 42
<i>A. flavus</i>	6 - 8	35 - 37	42 - 45
<i>A. niger</i>	6 - 8	35 - 37	46 - 48
<i>A. parasiticus</i>	10 - 13	37	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	25	35
<i>Byssoschlamys fulva</i>	10	30 - 35	45
<i>Cladosporium herbrum</i>	-5 - (-7)	24 - 25	30 - 32
<i>Fusarium avenaceum</i>	-3	25	31
<i>F. sporotrichioides</i>	2,5 - 2,7	23 - 30	35
<i>Mucor hiemalis</i>	4	36	44
<i>Penicillium expansum</i>	-3	25 - 26	33 - 35
<i>Rhizopus microsporus</i>	12	30 - 35	42
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	5	24 - 30	37
<i>Thalmidium roseum</i>	-7	27	-
<i>Trichothecium roseum</i>	15	25	35
<i>Wallemia sebi</i>	5	24 - 30	37 - 40

Nguồn: Dẫn theo Đậu Ngọc Hào (2003).

** Độ pH của môi trường*

Khác với một số vi khuẩn, nấm mốc có thể phát triển được ở phạm vi pH khá rộng, từ 2 - 8. Độ pH thích hợp nhất là từ 4,5 - 6,5, sự phát sinh và phát triển của nấm mốc không quá phụ thuộc vào độ pH của môi trường. Tuy nhiên sự hình thành độc tố lại rất phụ thuộc vào độ pH.

Bảng 1.2. Độ pH thích hợp nhất cho sự phát triển của một số loài nấm mốc

Loài nấm	Tối thiểu	Tối ưu	Tối đa
<i>Alternaria alternata</i>	< 2,7	5,4	> 8,0
<i>Aspergillus candidus</i>	2,1	-	7,7
<i>A. niger</i>	1,5	-	9,8
<i>Cladosporium herbrum</i>	3,1	-	7,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,0	-	9,0
<i>Mucor plumbeus</i>	-	7,0	-
<i>Neurospora sitophila</i>	> 3,0	5 - 6	> 8,0
<i>Penicillium cyclopium</i>	2,0	-	10,0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	< 6,8
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	9 - 10	-
<i>Trichoderma konogi</i>	2,5	-	9,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,0	6 - 7	8,0
<i>A. flavus</i>	2,5	7,5	> 10,5
<i>A. ochraceus</i>	3,0	6 - 7,5	> 8,0

Nguồn: Dẫn theo Đậu Ngọc Hào (2003)

** Chất dinh dưỡng trong cơ chất*

Cơ chất giàu protein và hydratcacbon (tinh bột, đường) sẽ thuận lợi cho nấm mốc sinh sản, phát triển. Các nguyên liệu thức ăn chăn nuôi thường giàu các chất dinh dưỡng nói trên. Vì vậy, nguyên liệu thức ăn và thức ăn hỗn hợp là cơ chất lý tưởng cho nấm mốc sinh sản, phát triển.

Ngoài các yếu tố trên thì thành phần không khí (chủ yếu là O₂ và CO₂), một số yếu tố khác như trạng thái vật chất (lỏng, rắn), điều kiện bảo quản (bao gói kín hay để trần), cũng có ảnh hưởng đến sự sinh sản và phát triển của nấm mốc.

Từ các điều kiện trên cho thấy: Việc chế biến và bảo quản thức ăn chăn nuôi có ý nghĩa quyết định đến việc khống chế hay tạo điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Chế biến và bảo quản sao cho ẩm độ của cơ chất ở mức cho phép, bảo đảm kho cất giữ thoáng mát, không để nguyên liệu thức ăn (cơ chất) tiếp xúc tự do với không khí thì nấm mốc sẽ khó sinh sản, phát triển.

1.1.4. Các nấm mốc thường gặp trong thức ăn chăn nuôi

- Trong ngô và sản phẩm của ngô: *Alesidia*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Cephalosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus glaucus* - groupe, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*.

- Trong lúa mỳ và các sản phẩm của lúa mỳ: *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. glaucus*), *Absidia*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Scopuslariopsis*, *Trichodema*.

- Trong gạo và cám gạo: *Alesidia*, *Corymleifera*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. sidowi*, *A. vericolor*, *Penicillium islaudium*.

- Trong sản phẩm sắn củ (sắn lát, bột sắn...): *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alecidia mucor* sp., *Rhizopus* sp.

- Trong thức ăn hỗn hợp của gia súc, gia cầm: *Aspergillus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp.

- Trong lạc, khô dầu lạc: *Acremonium* sp., *Aspergillus ficuum*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. (*P. decumbens*, *P. corylophylum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*...).

- Trong đậu tương và khô dầu đậu tương, bao gồm: *Altemaria* sp., *Aspergillus caudidus*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Cladosporium* sp., *Penicillium chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. urticae*, *P. viridicatum*.

- Trong bột cá: *Aspergillus* sp. (*A. glaucus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. ocharaceus*, *A. flavus*), *Penicillium* sp., *Alecidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp.

1.1.5. Các độc tố nấm mốc

Các nhà khoa học đã phát hiện được khoảng 300 chất độc do nấm mốc tiết ra, nhưng chỉ có khoảng 20 chất có tính độc cao đối với người và vật nuôi. Các chất đó là:

- Aflatoxin B₁

Độc tố do nấm mốc *Aspergillus Flavus* và *F. parasiticus* tiết ra, công thức hóa học là C₁₇H₁₂O₆, trọng lượng phân tử: 312, điểm nóng chảy 268 - 269°C, độc tố tan trong rượu, axeton, chloroform, dung môi hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 223, 265 và 362.

- Aflatoxin B₂

Độc tố do nấm mốc *A. flavus* và *A. parasiticus* tiết ra, công thức hóa học là C₁₇H₁₄O₆, trọng lượng phân tử: 314, điểm nóng chảy: 287°C, tan trong rượu, axeton, Cloroform, dung môi hấp thụ là methanol, bước sóng hấp thụ là 220, 265 và 363.

- Aflatoxin G₁

Độc tố do nấm mốc *A. flavus* và *A. Parasiticus* tiết ra, công thức hóa học: C₁₇H₁₂O₇, trọng lượng phân tử: 330, điểm nóng chảy 244- 246°C, tan trong rượu, axeton và cloroform, dung môi hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 243, 257, 264, 362.

- Aflatoxin G₂

Độc tố do nấm mốc *Aspergillus flavus* và *A. parasticur* tiết ra, công thức hóa học C₁₇H₁₄O₇, trọng lượng phân tử 330, điểm nóng chảy 230°C, tan trong rượu, axeton, cloroform, dung môi hấp thụ: Methanol, bước sóng hấp thụ: 217, 245, 365.

- Aflatoxin M₁

Độc tố do nấm mốc *A. flavus* và *A. Parasticus* tiết ra, công thức hóa học: C₁₇H₁₂O₇, trọng lượng phân tử: 328, điểm nóng chảy: 229°C, tan trong rượu, axeton, cloroform, dung môi hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 226, 265 và 357,

- Ochratoxin A

Độc tố do nấm mốc *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *Penicillium viridicatum*, *P. ostianus* tiết ra, công thức hóa học: C₂₀H₁₈O₆HN, trọng lượng phân tử: 403, điểm nóng chảy: 169°C, tan trong rượu, nước, dung môi hấp thụ: Methanol, bước sóng hấp thụ: 215 và 333.

- Citrinin

Độc tố do nấm mốc *A. candidus*, *A. terus*, *Pencillin citrinum*, *P. expansum* tiết ra, công thức hóa học: C₁₃H₁₄O₅, trọng lượng phân tử: 205, điểm nóng chảy: 175°C, dung môi hòa tan: chưa xác định, dung môi hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 222, 253 và 319.

- Sterigmatocystin

Độc tố do nấm mốc *A. nidunaus*, *A. ustus*, *A. versicolz* tiết ra, công thức hóa học: C₁₈H₁₂O₆, trọng lượng phân tử: 324, điểm nóng chảy: 246°C, dung môi hòa tan: cloroformpyridin, dung môi hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 208, 235 và 329.

- Palrelin

Độc tố có công thức hóa học: C₇H₆O₄, trọng lượng phân tử: 154, điểm nóng chảy: 110-111°C, tan trong rượu, cloroform, axeton và nước, dung môi hấp thụ: Methanol, Ethanol, bước sóng hấp thụ: 275, 276.

- Zearalenol

Độc tố do các nấm mốc *Fusarium roseum*, *F. equiseti*, *F. inivale*, *F. gilebosum*, *F. moniliforme* sản sinh ra, công thức hóa học C₁₈H₂₂O₅, phân tử lượng: 318, điểm nóng chảy: 164 -165°C, tan trong benzene, ete, chloroform, dung môi hấp thụ: chưa xác định, bước sóng hấp thụ: 236, 274 và 316

- T - 2 Toxin

Độc tố do các nấm mốc *Fusarium tricintum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. graminarum*, công thức hóa học: C₂₄H₂₆O₉, phân tử lượng: 446, điểm nóng chảy: 151 - 152°C, tan trong clofarform, rượu, dung môi và bước sóng hấp thụ: chưa có thông tin.

- Diacetoxyscirpenol

Độc tố do các nấm mốc *Fusarium tricintum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. graminarium* tiết ra, công thức hóa học: C₁₉H₂₆O₇, phân tử lượng: 366, điểm nóng

chảy 162 - 164°C, tan trong chloroform, rượu, dung môi và bước sóng hấp thụ: chưa có thông tin.

- *Deoxynivalenol*

Độc tố có công thức hóa học là $C_{15}H_{20}O_6$, phân tử lượng: 296, điểm nóng chảy: 151 - 153°C, tan trong rượu, cồn, dung dịch hấp thụ: Ethanol, bước sóng hấp thụ: 218.

Ngoài các độc tố nêu trên còn có các độc tố sau:

Patulin (do các nấm mốc *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *Penicillium patulum* tiết ra), moniliformin (do các chủng thuộc *Fusarium* tiết ra), alternarial (do *Alternaria alternata* tiết ra), sporidesmin (do *Phytophthora chortorum* tiết ra), fumatoxin (do các nấm *Aspergillus nidulans*, *A. ustus*, *A. versicolor* tiết ra), nivalenol (do *Fusarium nivale* tiết ra), vomitoxin (do *Fusarium graminearum*, *F. roseum* tiết ra), islatravosin (do *Penicillium islatravos* tiết ra).

Các độc tố của nấm mốc thường có điểm nóng chảy cao, trong điều kiện xử lý nhiệt đối với nguyên liệu thức ăn gia súc (phơi, sấy, nấu chín...) chúng hầu như không bị phá hủy. Bởi vậy, khi nguyên liệu thức ăn đã nhiễm nấm mốc thì khó có thể phá hủy được chất độc của nấm bằng xử lý nhiệt ở nhiệt độ thấp.

1.2. Tác hại của nấm mốc đối với vật nuôi và thức ăn chăn nuôi

1.2.1. Phân nhóm tác động của độc tố nấm mốc với vật nuôi

Căn cứ vào tác động của độc tố nấm mốc đến các cơ quan, bộ phận của cơ thể động vật, người ta chia ra thành các nhóm sau:

- Nhóm độc tố gây ung thư gan bao gồm: Aflatoxin, patulin, sterigmatocystin, luteoskyrin (islatravosin), penicillin axit.
- Nhóm độc tố gây độc đối với gan bao gồm: Aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin, luteoskayrin.
- Nhóm độc tố gây độc đối với thận bao gồm: Ochratoxin, citrinin.
- Nhóm tác động có hại đến cơ quan sinh dục bao gồm: Zearalenol và một số chất độc của *Fusarium trichothecenes*.
- Nhóm độc tố gây độc hại đối với thần kinh bao gồm: Esgotamin, citrioviridin.
- Nhóm độc tố gây độc đối với da và niêm mạc bao gồm: T-2 toxin, diacetocyscirpenol, nivalenol, sporidesmin, deoxynivalenol.

1.2.2. Tác động của một số độc tố đối với vật nuôi

* T-2 toxin và diacetocyscirpenol (DAS)

T-2 toxin và DAS là đại diện chính của nhóm độc tố trichothecenes.

- Đối với lợn: T-2 toxin và DAS gây dị ứng da, hủy hoại da, giảm bạch cầu, viêm dạ dày, ruột, yếu cơ tim, giảm khả năng tái tạo máu, giảm ăn, bỏ ăn, đi ỉa chảy, nôn mửa giảm tăng trọng.

- Đối với gia cầm

T-2 toxin gây tổn thương (mọc mụn nước) ở da, đùi, chân, gây tổn thương gan, thận và viêm loét niêm mạc miệng ở gà thịt.

T-2 toxin và DAS gây giảm sản lượng trứng, gây tổn thương gan, thận và gây loét niêm mạc miệng, gây viêm loét và thoái hóa đường tiêu hóa làm giảm tiêu thụ thức ăn, giảm tiêu hóa hấp thụ thức ăn dẫn đến giảm khả năng sản xuất hoặc bị chết.

* *Zearalenon(F-2 toxin)*

- Đối với lợn

Zearalenon gây ra các triệu chứng bệnh lý khác nhau tùy thuộc vào liều lượng độc tố, thời gian tác động của độc tố, tuổi, tính biệt của lợn.

Các triệu chứng bệnh lý thường thấy khi nhiễm độc là viêm đường sinh dục, phù âm hộ, âm đạo, mất động dục, sảy thai. Lợn mẹ nhiễm độc thì dẫn tới lợn con chậm lớn, còi cọc, bị bệnh lý cơ quan sinh dục (phình to cơ quan sinh dục bên ngoài và tử cung bên trong), lợn đực phát triển tính dục chậm. Lợn thịt trưởng thành ít chịu tác động của zearalenon.

- Đối với gà đẻ

Zearalenon gây giảm tỷ lệ đẻ, giảm tỷ lệ ấp nở của trứng, tồn dư lòng đỏ trong ống dẫn trứng, viêm mãn tính ống dẫn trứng dẫn đến casein hóa, trứng rơi vào xoang bụng, làm giảm bạch cầu, chủ yếu là lympho.

* *Ochratoxin*

Ochratoxin là độc tố đối với thận. Tùy theo liều lượng và thời gian nhiễm độc tố mà có các biểu hiện về triệu chứng, bệnh tích khác nhau ở gia súc, gia cầm.

- Đối với lợn

Lợn bị nhiễm độc nhẹ thì có biểu hiện khát nước, chuyển hóa thức ăn giảm, giảm trọng lượng. Lợn bị nhiễm độc nặng thì thận bị tổn thương. Các triệu chứng thường thấy khi lợn bị nhiễm độc là ỉa chảy, bỏ ăn, thận cứng và xám lại, khi xét nghiệm cơ thể thấy tăng ure máu, protein huyết thanh, men chuyển hóa amin, glucyl và protein niệu.

- Đối với gia cầm

Độc tố cũng làm cho gia cầm giảm chuyển hóa thức ăn, giảm tăng trưởng, rối loạn trao đổi sắc tố. Gà sinh sản sẽ chậm thành thực về tính, năng suất trứng giảm, giảm tỷ lệ ấp nở do phôi thai bị chết ngay trong tuần đầu.

Gà nhiễm độc ochratoxin thì thường thấy hiện tượng ỉa chảy, vỏ trứng có phủ một lớp phấn màu vàng.

Gà bị nhiễm độc cấp tính sẽ bị tổn thương gan, tụy, thận. Thận bị sưng to, trong niệu quản, thận, tim, cơ tim, gan, lách có chứa các chất urat màu trắng.

** Esgotin*

Esgotin do nấm mốc *Claviceps purpurea* sản sinh ra, nấm mốc này sinh sản và phát triển chủ yếu trên hạt ngũ cốc và nó có các hạch nấm gọi là seletiria esgotin. Trong các hạch nấm có 3 độc tố chính là esgotamin và esgometin, esgotoxin.

Khi bị nhiễm độc esgotin gia súc sẽ giảm ăn hoặc bỏ ăn, nhiễm độc nặng thì gia súc sẽ thở nhanh, mạch nhanh, hôn mê và có thể bị liệt.

Lợn nái khi nhiễm độc esgotin có thể bị giảm về số lượng con sinh ra, khối lượng sơ sinh và tỷ lệ nuôi sống, lợn mẹ có thể giảm sản lượng sữa hoặc mất sữa do esgotin ngăn cản quá trình hình thành prolactin trong giai đoạn chữa cuối. Sản lượng sữa giảm dần đến lợn con chậm lớn, còi cọc.

1.2.3. Tác hại của nấm mốc đối với thức ăn chăn nuôi

Khi thức ăn chăn nuôi bị nhiễm nấm mốc thì các tác hại chính do nấm mốc gây ra là:

Làm giảm hàm lượng protein trong thức ăn do protein bị phân hủy, làm giảm hàm lượng lipid của thức ăn do nấm mốc sản sinh ra men lipaza phân giải lipid, gián tiếp làm tăng tỷ lệ xơ trong thức ăn từ đó dẫn đến tỷ lệ tiêu hóa, hấp thu giảm và làm giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn.

Nếu ngô bị nhiễm mốc nặng thì có thể giảm tới 25% giá trị dinh dưỡng. Theo Tindall, 1983 (trích theo Đậu Xuân Hào, 2003) thì ngô bị nhiễm mốc đã giảm tỷ lệ protein từ 8,9% xuống 8,3%, lipid từ 4,0% xuống 1,3%, năng lượng trao đổi từ 3410 Kcal xuống 3252 Kcal/ Kg.

Các nấm mốc đã sản sinh ra các men phân giải protein, lipid, bột đường như: lipaza, proteaza, amilaza. Các men này phân giải thức ăn làm biến đổi màu sắc và mùi vị thức ăn. Sự biến đổi này đã làm giảm tính ngon miệng của thức ăn, giảm khối lượng thức ăn gia súc ăn được, cuối cùng dẫn đến sinh trưởng chậm, tăng tiêu tốn, chi phí thức ăn cho một đơn vị sản phẩm.

- Nấm mốc trong quá trình sinh sản và phát triển đã sản sinh ra các chất độc. Các chất độc này không chỉ gây ảnh hưởng đến sức khỏe của gia súc, mà còn ảnh hưởng cả đến sức khỏe của con người.

- Theo thống kê của tổ chức Nông - Lương của Liên hiệp quốc thì hàng năm nấm mốc gây thiệt hại tới gần 10% tổng số ngũ cốc và thực phẩm trên toàn cầu.

1.3. Các phương pháp phòng chống nấm mốc

Phòng chống sự phát triển của nấm mốc nói chung và nấm mốc sinh aflatoxin nói riêng là biện pháp quan trọng nhất, nhằm ngăn chặn sự giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn, đồng thời ngăn chặn sự phát triển của độc tố.

Có nhiều phương pháp phòng chống nấm mốc

1. Phương pháp phơi sấy để làm khô.
2. Phương pháp dùng hóa chất để ức chế sự phát triển của nấm mốc.
3. Phương pháp sinh học.

1.3.1. Phương pháp làm khô tự nhiên

Đây là phương pháp được áp dụng lâu đời trong quá trình bảo quản hạt.

Hạt ngũ cốc sau khi thu hoạch thường có độ ẩm rất cao, ví dụ ngô có thể từ 35 - 45%. Do đó phải tìm cách giảm độ ẩm của hạt xuống mức tối thiểu để cất giữ. Con đường đơn giản nhất là phơi khô, lợi dụng năng lượng ánh sáng mặt trời. Nếu ngô hạt đạt được độ ẩm < 13% trước khi bảo quản sẽ là lý tưởng, vì ở độ ẩm đó, nấm mốc không có điều kiện phù hợp để phát triển. Ở nhiều nơi do điều kiện thu hoạch không thuận lợi cho việc sử dụng năng lượng mặt trời, người ta dùng phương pháp sấy nhân tạo. Tuy nhiên cả phương pháp sấy nhân tạo và sử dụng nguồn năng lượng mặt trời đều tồn tại những nhược điểm sau:

- Phơi nắng gặp khó khăn khi trời nắng yếu hoặc mưa kéo dài.
- Sấy nhân tạo chỉ phù hợp với số lượng lớn hay sản xuất tập trung, không hoặc ít phù hợp với sản xuất nhỏ cá thể.

1.3.2. Phương pháp sử dụng hóa chất

Người ta sử dụng hóa chất ít độc hại hoặc vô độc để ức chế sự phát triển của nấm mốc. Các loại axit và muối của chúng như sorbat, propionat và benzoat từ lâu đã được sử dụng trong thương mại. Ngoài ra, đã sử dụng một số chất tách từ thảo mộc, các kháng sinh tổng hợp như natamycin có thể ức chế phát triển của nấm mốc ở các nồng độ thấp.

Hiện nay trên thị trường có bán nhiều loại chế phẩm chống mốc cho hạt, đặc biệt cho các nguyên liệu làm thức ăn của gia súc:

Myco-bloc của hãng BIAKON.N.V/Belgium.

Mold-NilTM- Dry của hãng Nutri-ad International BVBA.

Mold-Zap của Alltech, inc.

Các chế phẩm này được phối chế có các axit hữu cơ trong thành phần của chúng, chủ yếu là canxi propionat, sorbat và axit citric.

Một số loại hương liệu và gia vị cũng được sử dụng để bảo quản chống mốc như cây đinh hương, quế, mù tạc, hạt tiêu, tỏi, tinh dầu cam, chanh, chất chống oxy hóa...

1.3.2.1. Axit sorbic

Axit sorbic và muối sorbat đã được phép sử dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm chống nấm mốc. Axit sorbic có sẵn trong cây Askberries, cũng có thể được tổng

hợp hóa học. Nhược điểm của axit sorbic là tính hòa tan kém, vì vậy dạng muối kali được sử dụng nhiều hơn do hòa tan tốt. Axit sorbic chỉ hòa tan được 0,15% trong nước, còn kali sorbat hòa tan với 58,2%. Nhưng tác dụng chống nấm mốc của các muối sorbat kém hơn axit sorbic. Vì vậy, thông thường axit sorbic và muối kali sorbat được phối hợp với những tỷ lệ thích hợp để chống nấm mốc trong bảo quản.

Bandelin (1958) đã nghiên cứu khả năng ức chế nấm mốc của axit sorbic và nhận thấy nồng độ tối thiểu ức chế là 0,02% đối với *Alternaria solani* và nồng độ 0,08% đối với *Penicillium citrinum* và *Aspergillus niger*. Nồng độ này thấp hơn nhiều so với axit sorbic và axit propionat (bảng 1.3).

Bảng 1.3. Nồng độ axit tối thiểu ức chế một số nấm mốc

Hợp chất	Nồng độ ức chế tối thiểu của các loại nấm (%)		
	<i>Alternaria solani</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Axit benzoic	0,15	0,20	0,20
Axit propionic	0,06	0,08	0,08
Axit sorbic	0,02	0,08	0,08

Nguồn: Bandelin, 1958.

Người ta đã thí nghiệm khả năng của các axit sorbic và muối sorbat chống nấm mốc, đặc biệt là các loại nấm sản sinh độc tố như *Aspergillus penicillium* v.v... Udagawa và cộng sự (1977) nghiên cứu tác dụng chống nấm mốc của kali sorbat trên 5 mức khác nhau được nhiễm 3 loại nấm là: *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* và *Rhizopus stolonifer*. Lượng kali sorbat được đưa vào thí nghiệm là 0,01; 0,025 và 0,05%. Kết quả là 4 trong 5 loại đã không có nấm mọc trong suốt thời gian thí nghiệm ở nồng độ 0,01-0,025%. Thử nghiệm với *Aspergillus flavus* (loài nấm sản sinh aflatoxin) cho thấy, kali sorbat ở nồng độ 0,05% chỉ ức chế được 2% sự phát triển của nấm và 10% khả năng sản sinh aflatoxin, hàm lượng 0,25% ức chế được 10% nấm phát triển và giảm khả năng sinh sản aflatoxin tới 46%. Cũng ở nồng độ này (0,25%), ức chế tới 20% *Penicillium cyclopium*.

Masimango (1979) đã nghiên cứu tác động của một số loại hóa chất chống nấm *Aspergillus flavus* và nhận thấy axit sorbic và kali sorbat nồng độ 1% đã ức chế được hơn 50%, còn hàm lượng 0,1% chỉ làm giảm chút ít sự sản sinh aflatoxin (bảng 1.4).

Bullesman (1979) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của potassium sorbat đối với nấm *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium commune* và *P. patulum* trong môi trường lỏng. Lượng muối sorbat sử dụng là 0,05; 0,1; 0,15%. Kết quả cho thấy *A. parasiticus* bị ức chế phát triển mạnh hơn 2 loài nấm kia. Nồng độ 0,05% sorbat đã kéo dài thời gian ức chế *A. parasiticus* gấp đôi so với đối chứng.

Bảng 1.4. Ảnh hưởng của một số hóa chất chống mốc, ngăn cản sự phát triển và sinh sản của aflatoxin

Hóa chất	Nồng độ sử dụng và khả năng ức chế (%)		
	1%	0,5%	0,1%
Kali sorbat	96,5	58,5	6,5
Axit sorbic	97,1	57,8	10,2
Canxi propionat	33,1	-	-
Canxi propionat	52,3	49,2	-
Natri benzoat	23,2	-	-
Axit benzoic	23,6	-	-

Nguồn: Masimango và cs., 1979.

Ở nồng độ 0,1% thời gian ức chế kéo dài gấp 3 lần so với đối chứng. Ở nồng độ 0,15% ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. parasiticus*. Cũng theo thông báo của Bullerman, cả 3 loại nấm mốc được thử nghiệm trên đã không có khả năng sản sinh độc tố trong môi trường nuôi cấy.

1.3.2.2. Axit propionic

Axit propionic cũng được sử dụng rất rộng rãi trong bảo quản thực phẩm và thức ăn gia súc để chống mốc. Thường dùng dạng muối như: natri propionat hay canxi propionat. Axit propionic là một chất giống như dầu, có vị chua hơi cay và có mùi khó chịu, có thể hòa tan trong nước và các dung môi hữu cơ như rượu, ete, cloroform.

Tác dụng chống mốc của axit propionic và các muối của nó đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy dạng natri propionat và axit propionic có tác dụng tốt hơn canxi propionat. Canxi propionat ở hàm lượng 0,5% và 1% chỉ bảo vệ được mẫu khỏi mốc trong phạm vi 1 tuần, trong khi đó natri propionat và axit propionic nếu cùng nồng độ có thể bảo vệ mẫu khỏi mốc trong 17 tuần. Bandelin (1958) nhận thấy ở nồng độ 0,06% và 0,08%, trong môi trường nấm mốc có pH=5,0 axit propionic có tác dụng ức chế nhiều loài nấm mốc bao gồm nhóm *Aspergillus*. Axit propionic ở nồng độ 0,3% giữ được hạt mạch có hàm lượng nước 18% và 23% khỏi bị hư hỏng trong thời gian 5 tháng. Hàm lượng axit propionic 0,1% có thể kìm hãm sự nảy mầm của bào tử nấm mốc. Nhưng nghiên cứu khác lại cho thấy, nếu sử dụng axit propionic ở nồng độ 0,8% có thể chống mốc cho hạt có hàm lượng nước tới 20%. Trong các mẫu thí nghiệm với các hàm lượng trên đây đã không thấy *Aspergillus flavus* và độc tố aflatoxin. Sử dụng axit propionic 1% để bảo quản ngô bị nhiễm *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium viridicatum* và nhận thấy đã ức chế hoàn toàn 4 loại nấm trên và sự sản sinh độc tố của chúng trong thời gian 29 tuần. Trong khi đó ở mẫu đối chứng, *A. ochraceus* và *A. parasiticus* phát triển rất mạnh.

Theo Stewart (1977), axit propionic ở nồng độ 3 - 4% đã ức chế sự phát triển của nấm và sự sinh sản bào tử trong môi trường lỏng (bảng 1.5). Tuy nhiên ở nồng độ 3%, bào tử nấm mốc vẫn còn có thể phát triển được. Masimango nghiên cứu ảnh hưởng của canxi propionat đến khả năng sinh sản aflatoxin của *A. parasiticus*. Họ nhận thấy, axit propionic 0,5% và 1% đã làm giảm 52,3% và 49,2% aflatoxin, nồng độ 0,1% không ức chế được sự sinh sản độc tố trong môi trường nuôi cấy. Canxi propionat 1% chỉ hạn chế được 33,1% lượng aflatoxin sản sinh ra, còn hàm lượng 0,5% và 0,1 % không có tác dụng.

Bảng 1.5. Ảnh hưởng của axit propionic đến sự phát triển và sản sinh aflatoxin của *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 trong môi trường lỏng ở 28°C và pH=4,5.

Axit propionic (%)	Trọng lượng khô của hệ sợi nấm (mg)			
	0 ngày	2 ngày	6 ngày	10 ngày
0	0	776	1573	1007
1	0	336	1562	1005
2	0	0	1341	1337
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

Nguồn: Stewart, 1977

Mặc dù axit propionic và các muối của nó có tác dụng rất tốt để phòng chống sự phát triển của nấm mốc và sự sinh sản các độc tố, nhưng trong công nghiệp thực phẩm cũng ít được sử dụng, chỉ chủ yếu sử dụng trong công nghiệp sản xuất bánh mì. Ngày nay, các chất này được dùng nhiều trong bảo quản thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là các loại hạt, dưới dạng kết hợp giữa các muối của axit propionic và các muối của axit sorbic, axit citric...

1.3.2.3. Axit benzoic

Axit benzoic là chất thông dụng trong công nghiệp thực phẩm để phòng chống nấm mốc, tồn tại dưới dạng tự do và dạng kết hợp, như muối natri benzoat. Tác dụng kháng nấm của axit benzoic chủ yếu trong môi trường axit, ít có tác dụng trong môi trường trung tính.

Nồng độ muối benzoat cần thiết để ngăn chặn nấm mốc phát triển là 0,15% với *Alternaria solani*, 0,2% với *Penicillium citrinum* và *Aspergillus niger*. Khả năng sinh sản của *Aspergillus flavus* bị giảm xuống đáng kể khi có mặt của axit benzoic và natri benzoat. Sự giảm hàm lượng aflatoxin tương ứng với sự có mặt của hàm lượng benzoat. Ở nồng độ 0,8%, axit benzoic và natri benzoat không ngăn cản được sự sinh sản. Các tác giả cũng đều ghi nhận sự giảm và làm chậm quá trình hình thành bào tử của *Aspergillus flavus* với sự có mặt của axit benzoic và natri benzoat.

Ảnh hưởng axit benzoic và natri benzoat đối với sự hình thành aflatoxin trong môi trường nuôi cấy *Aspergillus flavus*.

Các nhà khoa học đã nghiên cứu tác dụng của axit benzoic với khả năng hình thành aflatoxin và nhận thấy, axit benzoic và natri benzoat nồng độ 1% đã ức chế được 23,6% nấm mốc và 23,2% sự sản sinh aflatoxin. Ở hàm lượng 0,5% và 0,1% không có sự ức chế nấm mốc sản sinh độc tố.

Chiplely và Uraih (1980) đã tìm hiểu ảnh hưởng của một số hàm lượng axit benzoic đến sự sinh sản aflatoxin của 2 loài nấm *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*. Họ cho biết, hàm lượng 0,01% của o-nitrobenzoat hoặc p-aminobenzoat đã thúc đẩy sự phát triển của *Aspergillus flavus* nhưng làm giảm sự hình thành aflatoxin. Cũng ở nồng độ như vậy thì ethyl aminobenzoat hạn chế sự phát triển của *Aspergillus flavus* nhưng lại thúc đẩy sinh tổng hợp aflatoxin.

Ethyl benzoat ở nồng độ 0,02% đã làm giảm sự phát triển của *A. flavus* và ngăn cản hoàn toàn sự sản sinh aflatoxin.

1.3.2.4. Một số kháng sinh

Natamycin - (pimaricin)

Natamycin có tác dụng ức chế nấm mốc, không có tác dụng đối với vi khuẩn. natamycin không được phép dùng chống nấm mốc trong thực phẩm ở Mỹ song lại được các nước ở Châu Âu sử dụng. Thuốc có thể ức chế nhiều loại nấm mốc ở hàm lượng rất thấp. Shahani thông báo, ở nồng độ 0,05% bảo quản chống nấm mốc cho hạt được từ 1 đến 5 ngày. Ở nồng độ thấp 1 ppm natamycin có thể ức chế nhiều loại *Penicillium*. Tuy nhiên, phải tới nồng độ 100ppm mới ngăn chặn được sự phát triển của *Aspergillus flavus*.

Thí nghiệm của Shahani (1973) cho thấy ở hàm lượng natamycin thấp hơn đã ức chế được sự phát triển và sản sinh độc tố của *Aspergillus flavus* và *A. ochraceus* (bảng 1.6).

Bảng 1.6. Tác dụng ức chế sự phát triển và sản sinh độc tố của natamycin đối với *Aspergillus flavus* NRRL 3000 và *A. ochraceus* NRRL 3174.

Hàm lượng Natamycin	<i>Aspergillus flavus</i> (% ức chế)		<i>A. ochraceus</i> (% ức chế)	
	Phát hiện	Sinh độc tố	Phát hiện	Sinh độc tố
0	0	0	0	0
1	0,3	25,0	16,0	93,2
10	37,8	62,0	46,0	100,0
50	71,4	99,0	52,2	100,0

Nguồn: Shahani, 1973, Shahani và Goldberg, 1972

Nghiên cứu của nhiều tác giả khác cũng cho thấy natamycin có thể ngăn cản sự hình thành các độc tố của nấm *Penicillium* trên môi trường nuôi cấy nhân tạo. Tác dụng ức chế sự sản sinh độc tố của thuốc mạnh hơn so với ức chế phát triển của nấm mốc.

Về ảnh hưởng của natamycin đối với nấm mốc mọc trên nhiều loại pho mát khác nhau, Shahani cho biết nồng độ 0,05-5ppm làm giảm sự hình thành bào tử của *Aspergillus parasiticus* và *Penicillium patulum*. Khi pho mát được nhúng vào dung dịch 0,1%-0,2% natamycin, nhiều loài nấm mốc đã không phát triển được. Aflatoxin không được sản sinh ra hoặc ở hàm lượng rất thấp không đủ để phát hiện.

Một số loại kháng sinh khác như: Bongkrekie axit và nisin cũng có tác dụng chống nấm mốc. Bongkrekie axit được tách từ môi trường nuôi cấy *Pseudomonas cocovenus*.

Nisin ở hàm lượng 5 và 125ppm đã ức chế sự phát triển của *A. parasiticus*.

1.3.2.5. Thảo mộc và gia vị

Rất nhiều loại thảo mộc có tác dụng chống nấm mốc. Theo công bố của Buchaman, cây quế (cinamon) có tác dụng ngăn cản sự phát triển của nấm mốc *Alternaria*, *Penicillium* và *Aspergillus*. Hạt tiêu, hành và đinh hương cũng có tính kháng nấm mốc nhưng yếu hơn.

Bullerman (1979) phát hiện thấy sự sản sinh aflatoxin của nấm *Aspergillus parasiticus* trong nhiều loại bánh mì khác nhau như bánh mì đen, trắng. Tuy nhiên đã tìm thấy rất ít hoặc hầu như không có trong bánh mì màu nho. Ở hàm lượng quế 0,02% đã gây ức chế phát triển của nấm mốc tới 31% và sự sản sinh aflatoxin giảm từ 25-97% trên môi trường nhân tạo. Methyloxynamaldehyde của cây quế với hàm lượng 100 mg/ml có tác dụng ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. Parasiticus* và *A. flavus*. Liều 200mg/ml hoạt chất trên ức chế sự phát triển của *A.ochraceus* và *A.versicolor*, nếu sử dụng liều 624mg/ml có thể ức chế tới 90% aflatoxin B₁ được sản sinh ra (bảng 1.7).

Bảng 1.7. Ảnh hưởng của quế đến sự phát triển và sản sinh aflatoxin của *Parasiticus* NRRL, 2999 trong môi trường yeast sau 10 ngày ở 25°C

Hàm lượng quế (%)	Tỷ lệ ức chế (%)	
	Sự phát triển	Sự sản sinh aflatoxin
0	0	0
0,02	16	25
0,2	23	57
2	31	97
20	100	100

Nguồn: Dẫn Đạt Ngọc Hào, 2003

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của 13 loại hợp chất từ thảo mộc và 7 đồ gia vị khô được bán trên thị trường hạn chế sự phát triển và sinh độc tố của nhiều loại nấm *Aspergillus* thì quế có tác dụng nhất. Tỏi, đinh hương, hạt tiêu Jamaica ức chế hoàn toàn sự phát triển của nhiều loại nấm mốc, nhưng nhiều loại gia vị và thảo mộc khác chỉ ức chế được sản sinh aflatoxin. Thymol được chiết tách từ cỏ xạ hương, engome từ đinh hương ở nồng độ < 0,4 mg/ml có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Aspergillus flavus* và *A.versicolor*. Liều 2mg/ml methanol chiết tách từ hạt anit cũng có tác dụng như vậy đối với các chủng nấm mới thử nghiệm. Buchaman cũng công bố ở hàm lượng 500mg/ml thymol ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. Parasiticus*.

Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy cây gia vị thường có tác dụng nhiều đến ức chế sự hình thành aflatoxin hơn là ức chế sự phát triển của hệ sợi. Nồng độ $\geq 5\%$ đinh hương đã ức chế hoàn toàn sự phát triển và sinh sản aflatoxin. Nồng độ $\geq 5\%$ bạc hà, thìa là Ai Cập và 10% của hạt tiêu bắc đen đã ngăn chặn được sự sản sinh aflatoxin.

1.3.2.6. Tinh dầu

Một số loại tinh dầu có tính kháng nấm. Nồng độ 0,2% tinh dầu cam có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. flavus*. Tinh dầu chanh ở hàm lượng 0,3-0,35% đã làm cho nấm *A. flavus* chậm phát triển và giảm sản sinh aflatoxin. Các tinh dầu khác như mentha arvenis và mentha piperita cũng có tác dụng chống nấm mốc rất tốt, đặc biệt là nấm sản sinh độc tố.

1.3.2.7. Các hóa chất bảo vệ thực vật

Dichlorvos là thuốc bảo vệ thực vật nhóm photpho hữu cơ. Ở hàm lượng rất thấp dichlorvos đã có tác dụng ức chế nấm mốc. Thuốc tác động mạnh đến khả năng tạo độc tố của nấm *A. flavus* và *A. parasiticus*, nếu sử dụng 200ppm đã ức chế tới 98% độc tố sinh ra ở môi trường lỏng, nhưng chỉ hạn chế được 5,6% nấm mốc phát triển. Ở hàm lượng thấp hơn (10ppm) ức chế được 2,4% nấm mốc, nhưng giảm được 96% aflatoxin. Dichlorvos cũng ảnh hưởng đến sự hình thành độc tố từ các nấm khác như *Penicillium*, *Fusarium*. Ở hàm lượng 20ppm, dichlorvos ức chế được nấm *Fusarium roseum* và *F. Graminearum* sản sinh zearalenon. Để có thể tác động đến nấm *A. ochraceus* thì cần lượng dichlorvos lớn hơn. Ở hàm lượng 100-300ppm dichlorvos làm giảm 11-18% nấm phát triển và giảm sinh tổng hợp 50-74% ochratoxin. Dichlorvos còn ức chế sự hình thành patulin và cotrin, hàm lượng 100ppm hạn chế 50% sự phát triển của *Penicillium* và giảm sự hình thành patulin tới 89%. Hàm lượng thấp dichlorvos (1ppm) không hạn chế được nấm nhưng lại giảm sự hình thành patulin tới 36,2%.

* Naled

Naled cũng là đồng phân của dichlorvos. Khi sử dụng naled ở nồng độ 0,01% đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Fusarium graminearum* và sự hình thành zearalenon. Ngoài ra còn được dùng để chống nấm mốc và sự hình thành độc tố trong ngô hạt.

* Methyl bromide

Methyl bromide (CH_3Br) là một chất chống nấm mốc và côn trùng ở thức ăn hạt. Người ta đã nghiên cứu tác dụng của methyl bromide đối với nhiều loài nấm mốc như *A. parasiticus* và *P. ruben* ở gạo. Ở hàm lượng 30 - 40 mg, methyl bromide có thể tiêu diệt 10^4 - 10^5 bào tử nấm trong 1g ngô. Các loài nấm sinh độc tố như *A. flavus*, *A. ochraceus*, *P. citrinum* cũng hoàn toàn bị tiêu diệt bởi methyl bromide. Một số công trình cho thấy nếu dùng chất này liều 120 mg/lít (0,012%) thì trong 4 giờ đầu 100% các bào tử nấm bị diệt.

* Methyl xanthine

Các methyl xanthine tự nhiên có trong các loại hạt cũng có tác dụng chống nấm mốc. Nhiều nghiên cứu cho thấy cafein ở hàm lượng 0,1% có tác dụng ức chế có tính chọn lọc các loài nấm mốc. Cafein cũng ức chế sự phát triển của *A. flavus* và sản sinh aflatoxin. Ở nồng độ 0,05%; 0,07% và 0,2% cafein làm giảm sự phát triển của nấm mốc tương ứng là: 18; 84 và 83%. Cũng ở nồng độ trên, sự sản sinh aflatoxin đã bị giảm thấp đáng kể.

Hạt cà phê còn xanh được làm mất hoạt chất cafein vẫn có tác dụng hạn chế nấm *A. flavus* sản sinh độc tố. Các methyl xanthine được tìm thấy trong coca cũng có tác dụng kháng nấm và sản sinh độc tố. Theophyllin với hàm lượng 0,8% trong môi trường nuôi cấy tổng hợp ức chế được 54% aflatoxin do *A. parasiticus* sản sinh. Theobromin cũng đã được thử nghiệm nhưng không thấy có các tác dụng trên.

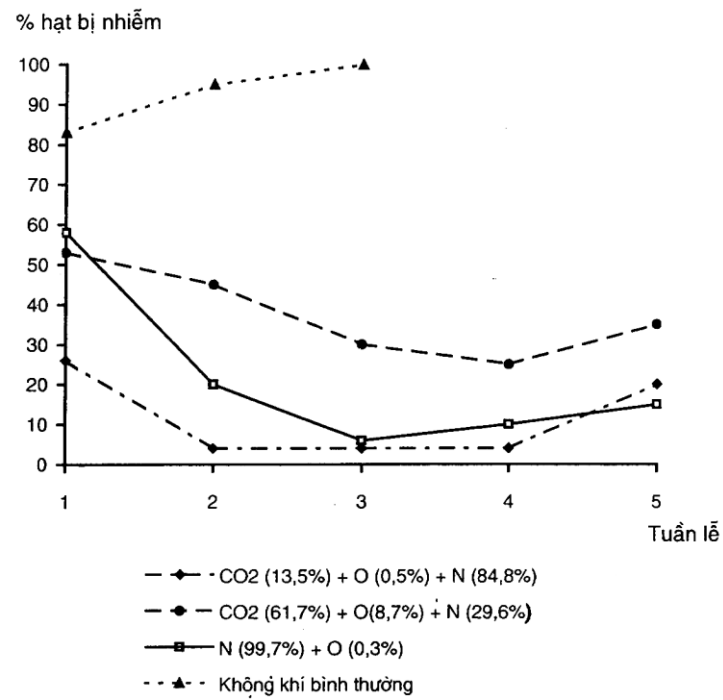
1.3.2.8. Ảnh hưởng của ẩm độ, nhiệt độ, oxy và CO_2 đến sự phát triển của nấm

Hệ nấm mốc có sự phát triển khác nhau tùy theo độ ẩm và nhiệt độ. Ở độ ẩm 80% và nhiệt độ 25°C thì *Penicillium* phát triển, 30°C thích hợp với *Aspergillus*, *Euroticus* ở 35°C và *Mucor* ở 45°C .

Nấm mốc giảm phát triển với nồng độ oxy là 0,1% và 21% là CO_2 nhưng không ngăn cản được sự phát triển.

Nhiều thí nghiệm cấy *A. flavus* và *F. moniliforma* ở ngô sau thu hoạch có độ ẩm cao (29,4%) và ngô làm ướt 19,6%, được đưa vào điều kiện bảo quản N_2 (99,7%) cho thấy ức chế sự phát triển của nấm.

Wall và Uota (1970) cho thấy *Alternaria alternata*, *Boytritis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* và *Cladosporin herbarum* phát triển kém dần theo nồng độ CO_2 từ 10, 20, 30 và 45% với 21% O_2 . Có tới một nửa nấm mốc đã được nghiên cứu bị ức chế khi trong không khí có 20,9% CO_2 . Nấm mốc *Fusarium roseum* phát triển khi có 10% CO_2 và bị ức chế phát triển khi trong không khí có 45% CO_2 (hình 1.1).



Hình 1.1: Ảnh hưởng của bảo quản ngô hạt ở các điều kiện có các thành phần không khí khác nhau, Willson và cs., 1975

Chương II

ĐỘC TỔ AFLATOXIN

2.1. Giới thiệu về độc tố aflatoxin

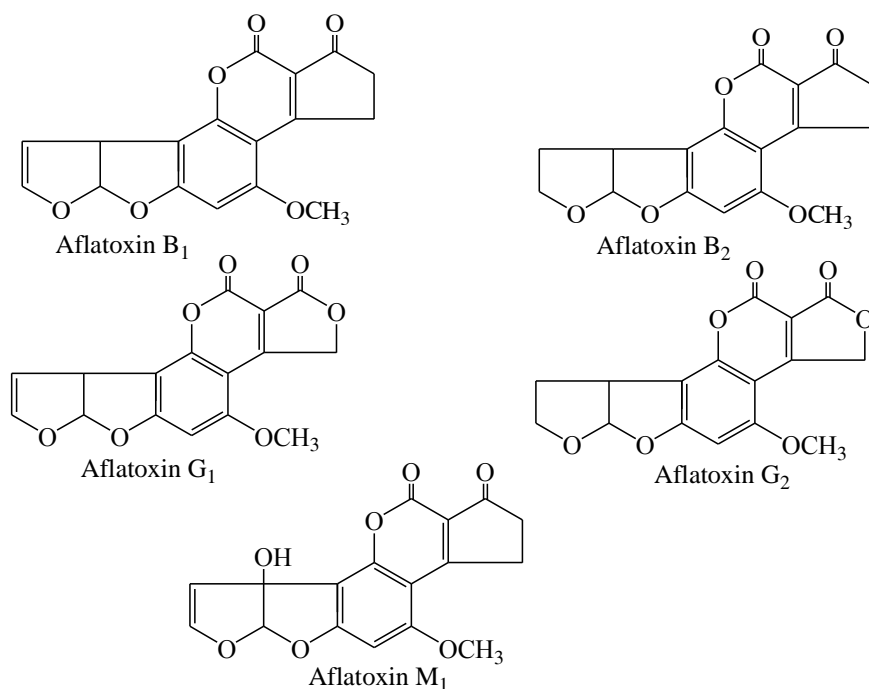
2.1.1. Nguồn gốc

Độc tố aflatoxin do các nấm mốc *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* sinh ra. Các nấm này thường thấy ở các loại hạt có dầu, hạt ngũ cốc, đặc biệt là hạt lạc, hạt ngô. Độc tố aflatoxin được phát hiện bởi các nhà khoa học Anh, Nga từ năm 1920, khi họ thấy trường hợp ngộ độc alcaloit ở người và gà. Đến năm 1960, tại Anh, hàng ngàn con gà tây đã bị chết do ăn phải thức ăn có lạc thối mốc. Các nhà khoa học nghiên cứu và phát hiện thấy chất độc aflatoxin ở lạc bị nhiễm nấm mốc này. Sau đó họ đã nghiên cứu ảnh hưởng của aflatoxin trên chuột và trên nhiều loại động vật khác nhau. Từ kết quả nghiên cứu, các nhà khoa học đã cảnh báo về mối nguy hại của thức ăn bị nhiễm nấm mốc và khả năng gây “bệnh dịch” của aflatoxin.

2.1.2. Cấu tạo và tính chất lý, hóa học

Các aflatoxin B_1 , B_2 và G_1 , G_2 đã được nhiều viện nghiên cứu xác định cấu trúc hóa học. Thoạt đầu các nhà hóa học đã xác định được có hai aflatoxin có công thức $C_{17}H_{12}O_6$ và $C_{17}H_{12}O_7$ với trọng lượng phân tử tương ứng 312 và 328. Hiện nay hai độc tố này được biết là aflatoxin B_1 , và G_1 . Trong cấu trúc phân tử có các nhóm lacton và metoxyl, không có nhóm hydroxyl tự do. Aflatoxin B_1 có màu huỳnh quang xanh da trời (blue), aflatoxin G_1 - xanh lá cây (green). Aflatoxin G_1 có chứa 2 vòng lacton, aflatoxin B_1 - 1 vòng lacton. Sau đó hai aflatoxin B_2 và G_2 cũng được phát hiện. Chúng có công thức hóa học hoàn toàn giống với aflatoxin B_1 , và G_1 chỉ khác là nối đôi trong vòng hydrofuran đã bị khử.

Năm 1966, các nhà khoa học phát hiện thấy trong môi trường nuôi cấy hai dẫn chất hydroxi-2 của aflatoxin B_2 và aflatoxin G_2 là aflatoxin B_{2a} và aflatoxin G_{2a} , trong sữa và thịt bò cũng có các dẫn chất của aflatoxin B_1 và B_2 , được đặt tên là aflatoxin M_1 và M_2 (Milk). Cả hai chất này đều bắt màu huỳnh quang màu xanh tím. Ở gan, thận và nước tiểu của cừu cũng tìm được hợp chất như vậy, trong nước tiểu của khỉ có aflatoxin P_1 dẫn chất của aflatoxin B_1 . Một aflatoxin khác cũng được phát hiện gọi là aflatoxin 3B hay parasiticol.



Hình 2.1: Cấu trúc hóa học của aflatoxin (Jones, 1977)

Bảng 2.1: Tính chất lý hóa của các aflatoxin

Aflatoxin	Công thức	Trọng lượng phân tử	Điểm nóng chảy	Huỳnh quang	Hấp thụ tia UV trong EtOH	Độ quay cực quang học CHCl ₃ [α] _D
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	Xanh lam	223,265 và 362	-558°
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	Xanh lam	222,265 và 362	-492°
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	Xanh lục	243,264 và 362	-556°
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	229-231	Xanh lục	221,265 và 357	-473°
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	Xanh tím	226,265 và 357	-280°
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	Xanh tím	221,264 và 357	-

Nguồn: Twonsend, Stubblefield và Beljeans (Dẫn theo Đậu Ngọc Hào, 2003)

2.2. Bệnh nhiễm độc aflatoxin ở vật nuôi (Aflatoxicosis)

Bệnh nhiễm độc aflatoxin ở vật nuôi rất phổ biến, đặc biệt ở các nước nhiệt đới, do thức ăn chăn nuôi chứa aflatoxin đã không được phân tích xác định trước. Các trường hợp ngộ độc quan sát được cho thấy, tất cả loài vật nuôi như gà, vịt, gà tây, lợn, bò v.v... đều bị ảnh hưởng bởi aflatoxin. Trong các cơ sở chăn nuôi tập trung, các giống gia súc và gia cầm ngoại nhập có năng suất cao thường xuất hiện ổ dịch liên quan tới aflatoxin. Nguyên nhân chính là do thức ăn dự trữ nhiều dễ bị nhiễm nấm và độc tố của chúng.

Trong những năm gần đây, khi công nghiệp chăn nuôi tập trung phát triển, nhiều vụ gây chết vật nuôi đã không tìm được nguyên nhân bởi các chẩn đoán chỉ tập trung vào

các nguyên nhân bệnh truyền nhiễm. Tới những năm 60 của thế kỷ này khi hàng trăm nghìn gà tây ở Anh bị chết thì tình cờ người ta phát hiện aflatoxin.

Như vậy dấu hiệu đặc trưng của nhiễm độc độc tố nấm mốc nói chung và nhiễm độc aflatoxin là không có những dấu hiệu đặc biệt. Chính vì thế các thú y viên không phải là người đầu tiên phát hiện được nguyên nhân gây chết vật nuôi do chất độc nấm mốc mà là các nhà hóa học.

Trong trường hợp nhiễm độc không gây chết ở vật nuôi, các biểu hiện triệu chứng lâm sàng thường thấy là kém phát triển, giảm sức sản xuất trứng, sữa, giảm tăng trọng và chuyển hóa thức ăn, mà các dấu hiệu đó thường không chỉ đặc trưng cho nhiễm độc tố. Chỉ sau khi phát hiện bệnh nhiễm độc aflatoxin ở gà tây, người ta mới tổng kết xây dựng một vài dấu hiệu phân biệt bệnh này với các bệnh truyền nhiễm và trúng độc khác (bảng 2.2). Tuy nhiên các dấu hiệu nhận biết lại phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó phải kể đến hàm lượng của chất độc ăn phải và thời gian kéo dài. Như thế sự chẩn đoán phân biệt có thể khác nhau từ trường hợp này đến trường hợp khác.

Bảng 2.2. Ảnh hưởng của aflatoxin có trong thức ăn đến các biểu hiện bệnh lý ở vật nuôi

Loại gia súc	Lượng aflatoxin (mg/kg thức ăn)	Thời kỳ nuôi dưỡng (tuần)	Tổn thương gan	Ảnh hưởng tới phát triển và hiệu quả thức ăn
Lợn (20-70kg)	0,14	12	Trung bình	Bình thường
	0,28	12	Nhẹ	Giảm sút
	0,41	12	Nhẹ	Giảm sút
Lợn (40-100kg)	0,28 và 0,41	20	Nhẹ	Giảm sút
Lợn (70-100kg)	0,69	7	Trung bình	Bình thường
Lợn nái (có chửa)	0,3-0,55	4	Rõ	Suy giảm và một số con chết
Gà Tây (1 ngày tuổi)	0,25	4	Rõ	Chậm phát triển và giảm trọng lượng
Gà thịt (broiler) (1 ngày tuổi)	0,2	7	Nhẹ	Giảm trọng lượng trong 3 tuần
	0,42	7	Nhẹ	
	0,5	7	Nặng	
Vịt (7 ngày tuổi)	0,03	4	Đặc tính điển hình nhiễm độc aflatoxin (1)	Giảm trọng lượng, chết 50%
Bê (4 ngày tuổi)	0,2	16	Trung bình	Giảm trọng lượng từ 0 đến 3 tháng
Bê vỗ béo (6 tháng tuổi)	0,66	20	Trung bình	Bình thường
Bò sữa	1,5	4	Trung bình	Giảm lượng sữa; aflatoxin M, có trong sữa

Nguồn: Allcroft, 1969

Ghi chú: Số liệu được tổng hợp từ những thí nghiệm khác nhau nên kết quả có thể có sự khác nhau.

(1) xem tại điểm a) mục 2.2.1

Cho đến nay, phần lớn các tư liệu về nhiễm độc aflatoxin tập trung chủ yếu vào chăn nuôi gia cầm. Lý do có thể không phải gia cầm mẫn cảm với aflatoxin hơn là các loài vật nuôi khác trừ vịt con. Song ở gà công nghiệp người ta thấy có những dấu hiệu bệnh lý liên quan tới nhiễm độc aflatoxin, mặc dù chúng vẫn khỏe mạnh. Đó là hội chứng xanh tím và chảy máu khiến cho chất lượng thực phẩm bị giảm sút và đặc biệt người tiêu dùng không có cảm tình với loại thực phẩm này. Hơn nữa trong chăn nuôi gà, màu vàng trên da và trong lòng đỏ trứng rất hấp dẫn người tiêu dùng, thì màu sắc này lại bị tác động làm giảm đi đáng kể bởi sự có mặt của aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi.

Nguyên nhân dẫn đến ảnh hưởng trên là do aflatoxin đã làm tăng tính dễ vỡ của lớp mao quản, cũng như làm mất chức năng là lớp đệm lót cho mạch quản khi có những tác động cơ giới. Mặt khác aflatoxin cũng gây ra sự ức chế quá trình đông máu, làm tăng hoạt tính của prothrombin, do đó, sự chảy máu trở nên liên tục không dừng.

Hơn thế nữa aflatoxin can thiệp vào quá trình hấp thụ, chuyển hóa và đào thải caroten, một chất màu có trong thức ăn góp phần tạo màu vàng của da và lòng đỏ trứng. Quá trình giảm hấp thụ caroten cũng là nguyên nhân gây hội chứng xanh tím trong mô bào của gia cầm.

Bên cạnh đó sự suy giảm hàm lượng lipid được hấp thụ từ thức ăn do ảnh hưởng của aflatoxin cũng dẫn đến giảm chất lượng thịt. Người ta thấy hàm lượng lipid trong phân của vật nuôi bị nhiễm độc aflatoxin cao hơn gấp 10 lần hàm lượng lipid trong phân của vật nuôi được ăn thức ăn không có aflatoxin. Lý do aflatoxin đã ảnh hưởng đến men lipaza của tuyến tụy, làm giảm hàm lượng men này. Aflatoxin còn tác động tới số lượng và chất lượng mật - một nhân tố quan trọng trong quá trình tiêu hóa mỡ.

Trong chăn nuôi lợn, aflatoxin ảnh hưởng đến sự phát dục và đặc biệt có thể gây sảy thai ở lợn. Lợn con theo mẹ có thể nhiễm aflatoxin qua sữa mẹ và có thể dẫn tới chết hay chậm lớn.

Ở bò sữa, aflatoxin có thể bị phân giải và đào thải qua sữa dưới dạng đồng phân là aflatoxin M₁, là chất độc nguy hiểm cho trẻ em.

Đối với gia cầm sinh sản, aflatoxin ảnh hưởng đến năng suất trứng và tỷ lệ trứng có phôi và ấp nở. Do aflatoxin có thể kết hợp với ADN trong phôi, đã làm cho nhiều phôi bị chết ở ngày thứ 7 sau khi ấp. Trứng gà thương phẩm không chỉ nhạt màu, mà còn nhỏ hơn bình thường và dễ vỡ do lớp vỏ bị mỏng đi. Số lượng tinh dịch và tinh trùng của gà trống giảm sút rõ rệt, đặc biệt ở gà Leghorn.

Nét đặc trưng nữa trong nhiễm độc aflatoxin ở vật nuôi là sự suy giảm tính đề kháng của cơ thể với mầm bệnh. Người ta đã chứng minh rằng nếu vật nuôi bị nhiễm độc aflatoxin thì tính kháng bệnh giảm sút rất lớn, đặc biệt bệnh cầu trùng (*Coccidiosis*), bệnh đơn bào (*protozoa*), Salmonellosis cũng như các bệnh truyền nhiễm do siêu vi trùng như bệnh Gumboro, bệnh Newcastle; bệnh do sán lá gan, bệnh do nấm men

Candida. Nguyên nhân là aflatoxin gây ức chế quá trình miễn dịch tiếp thu, do đó làm giảm hiệu lực của các vaccin phòng bệnh, tác động này như thế nào sẽ được nghiên cứu trên các đối tượng vật nuôi.

2.2.1. Nhiễm độc aflatoxin ở gia cầm

a) Bệnh nhiễm độc aflatoxin ở vịt

Vịt là vật nuôi mẫn cảm nhất với aflatoxin có trong thức ăn. Liều gây chết 50% động vật (LD₅₀) ở vịt là 0,3 mg/kg. Nhiều vụ dịch gây chết vịt đã được thông báo. Ở Anh, 2 ổ dịch gây chết vịt là do trong thức ăn có chứa bột khô dầu lạc nhập từ Braxin. Bệnh cũng được phát hiện thấy ở các đàn vịt nuôi ở Kênia, ăn thức ăn được bổ sung bột khô dầu lạc từ Đông Phi và từ bang Kerala Ấn Độ. Nhiễm độc aflatoxin của vịt cũng được phát hiện ở Việt Nam (Dẫn theo Đậu Ngọc Hào và cs., 2003).

Vịt bị nhiễm độc thường bỏ ăn, chậm phát triển, tiếng kêu không bình thường, da chân và da đuôi biến thành màu tím, rối loạn vận động, co giật, ưỡn lưng, có thể dẫn đến chết.

Các biến đổi cơ quan nội tạng cho thấy: Cơ thể bị phù nhẹ, gan xuất huyết, sưng to, rắn, mật sưng, thận sưng và xuất huyết, tá tràng sưng và chứa dịch rỉ viêm. Trong trường hợp cấp tính: Gan sưng to, màu vàng nhạt, vàng đất thó hay màu xám nhạt. Trong trường hợp mãn tính: Gan co lại, rắn chắc và xuất hiện các hạt, túi mật sưng to, chảy máu ở lách, thận và dưới da.

Các biến đổi vi thể điển hình là thoái hóa nguyên sinh chất dạng không bào, nhân tế bào bị phá hủy, ống mật dẫn ra, xuất hiện các sợi viêm, chảy máu lan tràn thành từng đám. Biểu mô ống thận cũng bị tổn thương, thoái hóa tế bào ống lượn, cầu thận teo, làm mất khả năng bài tiết.

b) Bệnh nhiễm độc aflatoxin ở gà

Về lịch sử phát triển của bệnh do aflatoxin, người ta nói đến vụ dịch gây chết 100.000 gà tây (Turkey Disease) ở Anh vào năm 1960. Gà bị nhiễm bệnh bỏ ăn và chết trong thời gian 7 ngày. Nhiều nguyên nhân đã được tìm kiếm như: Vi trùng, siêu vi trùng hay các chất độc kim loại nhưng đều không thuyết phục. Cuối cùng đã chiết tách được trong khô dầu lạc nhập từ Braxin về làm thức ăn bổ sung cho gà tây những chất có màu huỳnh quang xanh da trời (blue) dưới ánh sáng tia tử ngoại 365nm bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Từ đó, bệnh nhiễm độc aflatoxin trong vật nuôi liên tiếp được công bố trên phạm vi thế giới như ở Tây Ban Nha, Úc, Hungary và Ấn Độ. Ở Việt Nam, bệnh cũng được phát hiện ở các trại chăn nuôi gia cầm giống nhập ngoại (Dẫn theo Đậu Ngọc Hào và cs., 2003).

*** Triệu chứng của bệnh**

Gà bỏ ăn, giảm tăng trọng, hiệu quả chuyển hóa thức ăn thấp, giảm sản lượng trứng, sự phát dục của gà mái và gà trống chậm. Tỷ lệ chết thường cao, đặc biệt phụ thuộc vào

các yếu tố "Stress" như nóng, ẩm, chế độ chăm sóc nuôi dưỡng kém và các bệnh truyền nhiễm cộng phát. Mức độ nhiễm độc aflatoxin ở gà phụ thuộc vào loài, giống và lứa tuổi. Gà Tây mẫn cảm nhất, sau đó là gà Lô, gà Nhật, gà công nghiệp nhập ngoại và các giống gà nội.

Dấu hiệu quan sát thấy ở các đàn gà nhiễm độc aflatoxin không đặc trưng cho bệnh, vì nhiều loại bệnh khác nhau cũng có những biểu hiện tương tự. Để chẩn đoán đúng bệnh, cần kết hợp các yếu tố triệu chứng, mổ khám và đặc biệt là phân tích aflatoxin có trong thức ăn chăn nuôi.

** Bệnh tích đại thể và vi thể*

Ngộ độc aflatoxin ở gà cũng giống như ở vịt về bệnh tích đại thể và vi thể. Ở thể cấp tính, bệnh tích chủ yếu là gan vàng và sưng. Trong các trường hợp mãn tính, gan biến thành màu xám hay vàng xám và trở nên xơ cứng. Những xét nghiệm vi thể ở gan cho thấy các thùy gan bị tổn thương lan tràn kèm theo chảy máu, tế bào gan thoái hóa không bào, thoái hóa hạt và thoái hóa mỡ tùy theo hàm lượng aflatoxin (bảng 2.3).

Bảng 2.3. Tổn thương gan ở gia súc, gia cầm được ăn thức ăn có chứa aflatoxin

Tình trạng tổn thương	Bò	Bê	Lợn	Cừu	Vịt con	Vịt	Gà
Giãn ống mật	+	+	+	-	+	+	+
Tế bào gan sưng to	+	+	+	-	+	+	-
Hoại tử cấp tính và chảy máu	-	-	+	-	+	-	-
Viêm sợi huyết mãn tính	-	+	+	-	±	+	-

Nguồn: Wogan, 1966

Ghi chú: (+) là có gây tổn thương, (-) không gây tổn thương, (±) có thể có hoặc không

Trong nhiễm độc mãn tính, tế bào gan trương to, nhân sưng, xuất hiện nhiều dạng phân bào gián phân, giãn ống mật.

Liều aflatoxin bán cấp tính cũng gây ở gà dò các bệnh tích chung về tổn thương gan như: Gan biến thành màu vàng xám, chảy máu cục bộ, phát sinh các điểm hoại tử trắng và tăng lượng mỡ gan. Tế bào gan thoái hóa mỡ, thoái hóa không bào, nhân lồi lên, giãn ống mật và hình thành sợi huyết. Sự tăng sinh tế bào gan và tế bào ống mật nhằm khắc phục chức năng gan trong các trường hợp mãn tính, tế bào bắt màu kiềm. Trong quá trình viêm xuất hiện các bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính.

Ở gà tây, nhiễm độc aflatoxin á cấp tính xuất hiện sự suy giảm các tiểu quản trong các bè gan. Sự tăng sinh tái tạo các tiểu quản xuất hiện nhiều ở các rãnh ngang, và có xu hướng lan toàn tiểu thùy. Phát sinh các hạt nhỏ trong các tế bào ái toan.

** Suy giảm miễn dịch*

Nhiễm độc aflatoxin đã có mối quan hệ chặt chẽ với sự tăng tính mẫn cảm lên với các bệnh truyền nhiễm khác ở gà, do có sự mẫn cảm với bệnh cầu trùng. Tỷ lệ gà nhiễm

Salmonella cao hơn khi gà bị nhiễm độc aflatoxin hoặc tăng miễn cảm nhiễm bệnh viêm túi fabricius do virus (siêu vi trùng). Ở gà tây được dùng vacxin phòng bệnh tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*) đã không có miễn dịch khi thử thách với chủng gây bệnh và tăng tính miễn cảm với bệnh cầu trùng gây ra bởi *Eimeria adenolides*. Sự suy giảm miễn dịch trong trường hợp nhiễm độc aflatoxin được giải thích bằng nguyên nhân làm teo túi fabricius, tuyến thymus và lách. Sự hấp thụ và giải trừ sắt bị giảm ở gà dò dẫn đến thiếu máu, tổng số bạch cầu tăng lên.

** Thái trừ và tồn dư*

Trong cơ thể gia cầm chỉ tồn dư một lượng nhỏ, nhưng nhanh chóng được thải hồi, nếu như trong khẩu phần không có thêm aflatoxin tiếp tục. Ở gà dò, chất thải trừ có nồng độ cao nhất ở mề, gan, thận. aflatoxin B₁ được chuyển hóa thành aflatoxin B_{2a} và M₁ trong gan.

- Men gan NADP - nicotinamid dinucleotit photphat - có thể phân giải aflatoxin B₁ và B₂ thành cytopentenol và aflatoxintoxicol. Aflatoxin B₁ bị đào thải qua mật và nước tiểu cũng như phân theo tỷ lệ 70:15:15 theo các đồng phân B₁, B₂, B_{2a}, M₁.

Aflatoxin B₁, M₁ và aflatoxintoxicol là những chất thải chính ở gà tây với nồng độ cao nhất ở gan, thận, mề và phân. Phần lớn các chất thải trừ khỏi biểu mô khi không còn nguồn aflatoxin tiếp tục. Chất selen có thể làm giảm độc tố aflatoxin do chúng thúc đẩy làm tăng tỷ lệ aflatoxin dạng liên kết.

Ở vịt có sự thay đổi công thức bạch cầu do sự biến đổi nhân của tế bào bạch cầu, sự suy giảm chức năng của các thực bào (phagocytes) và hệ võng mạc nội mô. Hoạt lực của cơ thể giảm sút ở gà dò, sự đáp ứng miễn dịch tế bào giảm cả ở gà ta và gà tây.

Mặc dù có sự suy thoái miễn dịch do aflatoxin, nhưng những bằng chứng xác minh vẫn còn nhiều tranh cãi trên cả hai khía cạnh giải phẫu tổ chức các cơ quan có liên quan đến bạch cầu và sự đáp ứng miễn dịch chức năng sản sinh.

2.2.2. Nhiễm độc aflatoxin ở lợn

Lợn rất miễn cảm với aflatoxin. Trong những năm 1970-1980, tại Sông Bôi, Mường Hồng, Tô Hiệu (Sơn La) đã bùng phát ra một số ổ dịch lợn bị ngộ độc aflatoxin trong thức ăn, gây tổn thất rất lớn cho các cơ sở chăn nuôi. Nguyên nhân là do ngộ bị nhiễm aflatoxin B với hàm lượng >1000ppb. Trong các ổ dịch này, lợn con và lợn nái miễn cảm nhất và tỷ lệ chết rất cao.

LD₅₀ ở lợn là 0,62mg/kg trọng lượng cơ thể. Trong thức ăn, aflatoxin hàm lượng từ 2-4ppm có thể gây bệnh cấp tính. Liều 260ppb cho ăn trong nhiều tuần lễ gây chậm lớn, giảm tăng trọng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn. Liều 400ppb cho ăn trong nhiều tuần gây những biến đổi bệnh lý ở gan.

** Triệu chứng bệnh lý*

Dấu hiệu điển hình trong nhiễm độc aflatoxin ở lợn rất khó phân biệt với một số bệnh truyền nhiễm khác, đặc biệt là bệnh *Leptospira* và hướng điều trị chủ yếu là dùng

kháng sinh như streptomycin. Dấu hiệu quan sát được là sự suy giảm trọng lượng, bỏ ăn hay ăn ít, tiêu tốn thức ăn nhiều. Nét đặc trưng là da vàng, đặc biệt vùng niêm mạc như mắt, mũi, sau tai, da đùi, bẹn v.v... là những nơi dễ quan sát thay đổi màu sắc của da. Nguyên nhân do gan bị tổn thương, bilirubin tràn vào máu làm xuất hiện sắc tố vàng ở da. Nước tiểu ít, màu vàng và có mùi rất khét rất giống với mùi nước tiểu trong bệnh *Leptospira*. Nguyên nhân còn do tổn thương thận và lượng bilirubin trong nước tiểu tăng. Đôi khi cũng quan sát thấy các dấu hiệu ở phân như: Phân màu xám, xám nhạt do bilirubin không được chuyển qua mật vào ruột giúp tiêu hóa, phân có khi lẫn máu. Tổn thương đại thể phát hiện thấy chủ yếu ở gan, thận. Gan bị biến màu, trở nên xám nhạt, có trường hợp màu vàng nhạt hay màu vàng đất thó. Trong trường hợp mãn tính, gan bị teo hay cứng lại, sần sùi do tổ chức xơ phát triển.

Ở giai đoạn tiếp theo thường xuất hiện các u hạt nổi lên trên bề mặt của gan. Thận sưng to ở giai đoạn đầu, có màu vàng đất hay màu xám nhạt, sau đó trở nên xơ cứng, teo. Chức năng bài tiết bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Bệnh lý vi thể ở gan cho thấy các dạng thoái hóa và hủy hoại tổ chức, chảy máu ở trung tâm tiểu thùy rất điển hình.

** Biến đổi tổ chức và chức năng sinh lý, sinh hóa*

Cũng như ở gia cầm, nét đặc trưng của nhiễm độc giai đoạn đầu là gan thoái hóa mỡ. Trong tổ chức tế bào nhiễm nhiều hạt mỡ, tạo màu sắc vàng nhạt và rất dễ vỡ. Thoái hóa rất phổ biến ở các vùng trung tâm. Nhiễm độc thể mãn tính, thường xuất hiện các tế bào gan khổng lồ, nhân tế bào đột biến, phát triển dạng sợi trong nội ống và tăng sinh mô ống mật.

Các biến đổi sinh hóa trong bệnh nhiễm độc aflatoxin cũng đã được nghiên cứu. Sự sản sinh nhiều prothrombin làm giảm thời gian đông máu. Hoạt độ các men sGOT và sGPT tăng lên do các tế bào gan bị hủy hoại.

Protein tổng số giảm do quá trình sinh tổng hợp protein bị ảnh hưởng. Ngoài ra, các thành phần khác như tổng số sắt liên kết, albumin, globulin, cholesterol, ure máu cũng bị giảm.

Chẩn đoán nhiễm độc aflatoxin không thể chỉ dựa vào triệu chứng quan sát. Cần phải tìm kiếm sự có mặt của aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi. Nếu trong khẩu phần ăn có từ 500 đến 700ppb aflatoxin, lợn con theo mẹ sẽ chậm lớn do bú sữa mẹ có aflatoxin M₁.

Ở lợn mẹ thường xuất hiện vàng da, lông xơ. Cả lợn mẹ, lợn choai và lợn con đều rất dễ cảm nhiễm.

2.2.3. Nhiễm độc aflatoxin ở các loài vật khác

a) Ở trâu bò

Nhiễm độc aflatoxin ở đại gia súc thường ít gặp hơn ở gia cầm và lợn. Bò sữa do được ăn thức ăn giàu protein như khô dầu lạc, khô dầu bông v.v... lượng aflatoxin không đủ để có thể gây độc cấp tính. Tuy nhiên, đối với bò sữa thì mức độ nguy hiểm

của thức ăn có chứa aflatoxin là do sự đào thải độc tố qua sữa. Aflatoxin cũng có thể bị phân hủy một phần ở dạ cỏ do hệ vi sinh vật trong dạ cỏ rất phong phú.

Vào những năm 1960 những bê non được ăn khẩu phần có chứa 15% bột khô dầu lạc nhập từ Braxin đã có những biểu hiện của nhiễm độc aflatoxin, gan xơ và giãn ống mật. Năm 1962 một vụ nhiễm độc tương tự gây chết 4/16 bê. Triệu chứng và bệnh tích cũng giống như trường hợp trên, chủ yếu là sự phá hủy tế bào gan và tăng sinh ống mật. Một bê già hơn được ăn khẩu phần có chứa 2000ppb aflatoxin B₁, đã bị chết sau đó. Năm 1981, 12/90 bê đã bị chết do ăn phải thức ăn có khô lạc khi phân tích chứa tới 2230ppb aflatoxin B₁.

Một vụ nhiễm độc ở bê do aflatoxin có trong thức ăn đã được phát hiện ở Tây Ban Nha, 448 bê trong số 2532 bê vỗ béo đã bị chết. Nguyên nhân do bê ăn ngô bị nhiễm nấm có chứa aflatoxin B₁. Bột ngô đem cho vịt ăn đã gây chết 100% vịt thử nghiệm.

Khi mổ khám các bê bị chết, người ta đã quan sát thấy bệnh tích điển hình của nhiễm độc aflatoxin: Chảy máu ở túi mật, dạ dày, ruột non, ruột già, tim và gan. Các nhà nghiên cứu đã thực nghiệm bằng cách bổ sung các hàm lượng aflatoxin thích hợp vào khẩu phần ăn của bò để xác định sự mẫn cảm của chúng đối với aflatoxin và khả năng gây chết cấp tính. 50 bê non được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm 10 con và được ăn khẩu phần có chứa 1000, 700, 300, 100 và 0ppb aflatoxin B₁. Kết quả cho thấy ở nhóm ăn thức ăn có chứa 1000ppb đã có 2 trong 10 bê bị chết. Sau 59 và 137 ngày, gan của 3 trong 8 bê còn lại bị tổn thương, giảm chuyển hóa thức ăn. Hàm lượng aflatoxin 700ppb không gây chết bê trong thời gian nuôi 133 ngày nhưng gây tổn thương gan 2 trong số 10 bê và giảm chuyển hóa thức ăn. Ở các nhóm thí nghiệm còn lại, gan bê không bị tổn thương nhưng có biểu hiện biếng ăn. Không phát hiện thấy độc tố tồn dư trong gan thậm chí ở hàm lượng 1000ppb. Như vậy bê non cũng là động vật mẫn cảm với aflatoxin nhưng ở mức độ trung bình và có thể chịu đựng được đến hàm lượng 300ppb.

Bò sữa là loại gia súc cần được bảo vệ khỏi bị nhiễm độc aflatoxin có trong thức ăn, bởi vì aflatoxin B₁ sẽ được đào thải qua sữa dạng đồng phân aflatoxin M₁. Các tổ chức quốc tế và nhiều quốc gia đã đề ra những hạn chế về hàm lượng độc tố trong thức ăn của bò sữa nhằm tránh được mối nguy hiểm của aflatoxin M₁ cho con người. Cộng đồng Châu Âu (EEC) chỉ cho phép giới hạn tối đa của aflatoxin B₁ trong thức ăn cho bò sữa là 10ppb.

Nghiên cứu khả năng thải qua sữa của aflatoxin B₁ cho thấy có tới 3,3% aflatoxin B₁ được thải qua đường này ở dạng aflatoxin M₁. Bò sữa cũng mẫn cảm với aflatoxin, nếu trong khẩu phần ăn có 500ppb aflatoxin B₁, đã gây chậm phát triển và giảm chuyển hóa thức ăn.

b) Ở cừu

Chưa thấy có công bố về nhiễm độc aflatoxin ở cừu. Lý do có thể do cừu chỉ được ăn cỏ nên ít có cơ hội bị nhiễm aflatoxin vì độc tố này không có trên đồng cỏ, trừ những trường hợp cừu được ăn thêm khẩu phần vỗ béo có chứa bột vào mùa đông.

c) Ở thỏ

Thỏ là loài vật rất mẫn cảm với aflatoxin, LD₅₀ là khoảng 0,3mg/kg thể trọng, tương đương với liều gây chết vệt. Nếu trong khẩu phần ăn của thỏ chứa 330ppb aflatoxin B₁ thì thỏ đã bị chết, sau 3 tuần thí nghiệm tỷ lệ chết lên tới 30%. Mô khám bệnh tích đã xác nhận sự hủy hoại tế bào gan.

d) Ở cá

Bệnh aflatoxin chỉ quan sát thấy ở cá chăn nuôi tại các trại cá thương phẩm. Cá hồi mẫn cảm nhất đối với aflatoxin.

Thí nghiệm cho thấy liều LD₅₀ ở cá hồi cũng tương đương với vệt và thỏ. Người ta cũng gây các u ung thư thực nghiệm ở cá hồi. Lượng độc tố 0,5ppb trong khẩu phần thức ăn đã làm tăng một cách có ý nghĩa các trường hợp u ung thư ở loài *Mt. Mhastra*. Hàm lượng 20ppb aflatoxin B₁ trong thức ăn hàng ngày có thể gây chết, 36% trường hợp có u ung thư gan sau 12 tháng. Aflatoxin G₁ cùng hàm lượng trên chỉ có thể gây cho loài này 17% trường hợp u ung thư gan sau 16 tháng thử nghiệm. Tuy nhiên, các loài cá hồi khác nhau cũng mẫn cảm khác nhau với aflatoxin B₁. Riêng loài cá hồi *Salmo aguabonita* là hoàn toàn kháng lại với aflatoxin B₁. Đã có nhiều vụ nhiễm độc aflatoxin "trong nước". Nhiều trường hợp nhiễm độc ở cá được phát hiện tại Mỹ, bệnh nhiễm độc kiểu này là do thức ăn của cá chứa bột hạt bông bị nhiễm aflatoxin.

Những vụ chết cá tương tự đã được nói đến trong các tư liệu từ những năm 1936. Vì vậy, để tránh thiệt hại có thể nuôi những giống kháng với aflatoxin hoặc cần chú ý tới khẩu phần ăn của chúng.

2.3. Điều kiện để *A.flavus* phát triển và sản sinh aflatoxin ở ngô hạt

2.3.1. Điều kiện môi trường

Các nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển *A. flavus* trong ngô bảo quản sau thu hoạch là nhiệt độ, độ ẩm của môi trường và cơ chất. Ngược lại với nhân tố nhiệt độ ảnh hưởng đến sự sản sinh độc tố aflatoxin trước thu hoạch thì độ ẩm lại đóng vai trò quan trọng sau thu hoạch. Độ ẩm môi trường tối thiểu để nấm mốc phát triển sau thu hoạch là 85%. Các bào tử nấm mốc có thể nảy mầm được trong điều kiện có độ ẩm môi trường từ 81-82%. Tuy nhiên các nghiên cứu khác cho thấy phải cần độ ẩm môi trường đạt 85%. Nếu cơ chất là ngô và gạo thì cả hai loại ngũ cốc này có thể cần độ ẩm thấp nhất để nấm *A. flavus* phát triển và sản sinh độc tố aflatoxin so với các cơ chất khác. Khi độ ẩm môi trường tăng lên trên 85% - điều đó cũng có nghĩa là sự phát triển của *A. flavus* cũng tăng lên một cách đáng kể. Như vậy nếu độ ẩm môi trường ở giới hạn này

tăng lên một chút thì nguy cơ sự có mặt của aflatoxin tăng lên. Hầu như chưa có giới hạn trên nào của độ ẩm môi trường được xác định có tác dụng ngăn cản sự phát triển của nấm mốc và sản sinh aflatoxin trong môi trường nuôi cấy nhân tạo cung cấp khí đầy đủ, trừ khi dưới những điều kiện không bình thường. Tuy nhiên trong điều kiện tự nhiên, nếu độ ẩm môi trường quá cao sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của *A. flavus* do sự phát triển mạnh mẽ của các vi sinh vật khác, ở hàm lượng độ ẩm của môi trường và cơ chất cao thì các loại nấm khác, nấm men và vi khuẩn sẽ phát triển lấn át *A. flavus* hoặc các vi sinh vật này tạo ra môi trường thiếu không khí sẽ hạn chế sự phát triển của *A. flavus* và sự sản sinh aflatoxin.

Độ ẩm cơ chất trong quá trình bảo quản sau thu hoạch là nhân tố rất quan trọng. Nếu độ ẩm của hạt đạt 16%, nấm *A. flavus* khó có thể phát triển nhưng nếu độ ẩm lớn hơn 17%, nấm mốc đã bắt đầu phát triển tốt, ở hàm lượng độ ẩm từ 18-19%, *A. flavus* phát triển rất nhanh. Nhiều nghiên cứu chứng minh độ ẩm cơ chất cao là điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Aflatoxin sản sinh ra ở lúa mạch có độ ẩm là 24-26%, nhưng không sản sinh ở độ ẩm 20%. Aflatoxin có thể sản sinh ra ở ngô sau khi thu hoạch có độ ẩm từ 20-28%, đặc biệt khi nhiệt độ môi trường từ 20-30°C (bảng 2.4).

Ở nhiệt độ môi trường thấp tới 8°C, *A. flavus* vẫn có thể phát triển và người ta thấy chúng có thể vẫn sản sinh ra aflatoxin. Nhiệt độ 11°C ở gạo và 14°C ở lạc có thể sản sinh được aflatoxin do nấm *A. flavus* phát triển và phát sinh. Tuy nhiên ở nhiệt độ tối thiểu này *A. flavus* chỉ có thể sản sinh được aflatoxin nếu như các yếu tố khác là tối ưu. Nhiệt độ từ 20-35°C là thích hợp nhất cho sự hình thành aflatoxin. Ở nhiệt độ 37-43°C có thể là giới hạn tối đa để nấm *A. flavus* sản sinh được aflatoxin, đặc biệt mới có nấm *A. flavus* phát triển được ở nhiệt độ từ 44-46°C.

Bảng 2.4. Khả năng sản sinh aflatoxin trên ngô có độ ẩm khác nhau

Độ ẩm trung bình của ngô (%)	Độ ẩm tương đối môi trường (%)	Lượng aflatoxin B ₁ (µg/g)			
		14 ngày		28 ngày	
		Giống ngô 1	Giống ngô 2	Giống ngô 1	Giống ngô 2
16,5	84,2	ND	ND	ND	ND
16,7	85,1	ND	ND	ND	25
17,3	86,0	10	30	45	1100
17,6	86,9	25	750	150	1675
18,0	87,7	140	500	600	3375

Ghi chú: ND: Không tìm thấy aflatoxin. Nguồn: Sauer và Burraoughs, 1980

Nếu cả độ ẩm môi trường, nhiệt độ và hàm lượng nước cơ chất tối ưu, thì sự hình thành aflatoxin chỉ sau 48 giờ. Người ta thí nghiệm trên ngô có độ ẩm 21% được bảo quản trong chum ở 30°C, nếu dùng không khí lạnh bơm vào ngay thì nấm *A. flavus* ít

phát triển và không hình thành aflatoxin. Nhưng nếu bơm khí lạnh từ từ trong vòng 20 tới 40 giờ thì nấm *A.flavus* có thể phát triển và sản sinh ra aflatoxin.

Thành phần khí quyển trong quá trình bảo quản cũng là những nhân tố làm giới hạn sự phát sinh và phát triển của nấm mốc. Nhiều thí nghiệm đã chứng minh khi CO₂ ở nồng độ cao hay khi O₂ ở nồng độ thấp đều có thể ức chế sự phát triển của nấm mốc. Tác dụng này sinh học tới sự hình thành aflatoxin mạnh hơn là sự ức chế phát triển nấm mốc.

2.3.2. Thu hoạch và làm khô

Quá trình thu hoạch và làm khô hạt bảo quản có thể gây ra sự hư hại mang tính chất cơ giới đối với hạt và đó là nguyên nhân gây ra sự phát triển của nấm mốc trong đó có *A.flavus*. Dưới điều kiện môi trường thuận lợi, sự phát triển của *A.flavus* ở các hạt bị tổn thương này nhanh hơn nhiều lần so với hạt bình thường. Sự hư hại hạt như gãy vỡ là do quá trình thu hoạch, tách hạt, phơi sấy gây ra và có thể còn do sâu mọt phá hủy hạt. Người ta nhận thấy, nếu quá trình hư hại hạt xảy ra ở khu vực mầm hạt thì nấm mốc phát triển nhanh hơn là ở hạt. Vì vậy trong quá trình thu hạt làm khô và bảo quản cần phải lưu ý những tổn hại này.

Nhiệt độ làm khô hạt cao có tác động tới sự phát triển *A.flavus* bởi vì nó sẽ có xu hướng làm giảm thấp hàm lượng nước trong cơ chất ở dưới mức tối thiểu. Nhiệt độ sấy khô cao cũng có thể làm hạt bị chết, như vậy sẽ làm tăng tính miễn nhiễm của hạt đối với nấm mốc khi điều kiện ngoại cảnh bên ngoài không thuận lợi. Sự sấy khô ở nhiệt độ cao cũng có thể gây ra sự dễ vỡ của hạt so với làm khô trong tự nhiên. Một số nấm mốc và bào tử nấm mốc có mặt trên hạt sẽ bị diệt trong quá trình sấy khô ở nhiệt độ cao. Tuy nhiên nếu như các loài nấm mốc bị tiêu diệt thì sau đó sự tái nhiễm lại thuận lợi hơn đối với *A.flavus* vì thiếu sự cạnh tranh sinh vật và vì bản thân *A.flavus* là loài ưa nhiệt hơn (Thermotolerant). Nhưng sau khi bị tiêu diệt, cần phải có thời gian lâu dài hệ nấm mốc mới có thể được tái lập.

Làm khô ở điều kiện tự nhiên, nhiệt độ thấp có ưu điểm hơn là tiết kiệm được nhiên liệu và tránh được sự hư hại hạt trong quá trình sấy khô ở nhiệt độ cao.

Phơi khô ở nhiệt độ thấp, cần phải tiêu tốn thời gian nhiều ngày mới có thể dẫn đến lượng độ ẩm của hạt an toàn tránh sự xâm nhập của nấm mốc, nhưng trong quá trình đó lại nâng cao khả năng nấm mốc có thể xâm nhập và sản sinh aflatoxin. Nếu nhiệt độ đó thấp hơn 20°C thì khả năng sản sinh aflatoxin cũng rất hạn chế vì nấm *A. flavus* cũng không phát triển mạnh mẽ ở khu vực nhiệt độ này. Ở nhiệt độ cao hơn, mối nguy hiểm do nhiễm aflatoxin tiềm tàng hơn. Một số thí nghiệm cũng đã chứng minh rằng nếu làm khô ở nhiệt độ thấp thì sẽ tránh được sự nhiễm aflatoxin.

Một cách khác để làm giảm sự xâm nhập của nấm mốc vào hạt ngô, ở lớp trên của kho bảo quản người ta bố trí hệ thống trộn để bảo đảm tránh sự tập trung độ ẩm của hạt ở lớp trên. Người ta cũng còn có nhiều con đường khác để chống sự xâm nhập của nấm mốc vào hạt bảo quản, như dùng các hóa chất và các biện pháp sinh học sẽ đề cập ở phần sau.

2.4. Phương pháp phân tích aflatoxin

Có hai phương pháp được sử dụng để phân tích aflatoxin: Phương pháp vật lý hóa học và phương pháp hóa sinh học.

2.4.1. Phương pháp vật lý hóa học

Phương pháp này dựa trên nguyên lý các aflatoxin dễ dàng tách ra khỏi mẫu phân tích bằng các dung môi hữu cơ phân cực mạnh như cloroform, methanol, ethanol, axeton, benzen. Các aflatoxin cũng có tính không hòa tan trong các dung môi hexan, ete petrol, ete etylic.

Từ năm 1961, các nhà khoa học đã chiết xuất aflatoxin trong khô lạc bằng methanol. Đây là phương pháp đơn giản đầu tiên, aflatoxin được hòa tan trong methanol và được loại mỡ bằng ete petrol. Dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng để tách aflatoxin và được phát hiện dưới ánh sáng tử ngoại (UV) ở bước sóng 360nm.

Chiết xuất aflatoxin bằng cloroform có thể tách hoàn toàn aflatoxin ra khỏi cơ chất, được làm sạch mỡ qua cột hexan và ete etylic, thu hồi lại bằng cloroform, bốc hơi cloroform và sử dụng cho phân tích tiếp theo.

2.4.1.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography - TLC)

Phương pháp sắc ký lớp mỏng được sử dụng rộng rãi để xác định lượng aflatoxin lần đầu tiên vào những năm 1960. Các bản được tráng bởi silica gel được sử dụng để phân tích. Dung môi sử dụng cho dung dịch chạy bản mỏng là (chloroform: methanol) và (chloroform: axeton). Việc thêm nước vào hệ thống dung môi sẽ làm tăng khả năng hòa tan aflatoxin.

Hệ dung môi gồm: (nước: axeton: chloroform) tỷ lệ: (1,5:12:88 v/v) được đánh giá có khả năng hòa tan aflatoxin tốt nhất. Các bản mỏng sau khi đi qua các dung môi, được đưa vào chiếu bởi đèn tử ngoại (UV) ở bước sóng 365nm. Các vết mẫu phân tích có màu huỳnh quang xanh da trời hay xanh lá cây và có độ dài R_f được so sánh với các vết của aflatoxin tiêu chuẩn. Phương pháp này có thể xác định được lượng từ $3-4 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}$ (0,3-0,4ng).

Nhược điểm của phương pháp này là phụ thuộc vào trình độ kỹ thuật của người phân tích. Khi so sánh giữa mẫu nghiên cứu và mẫu của độc tố chuẩn có thể có sự sai lệch kết quả tới 20-30%.

* Phương pháp đo mật độ huỳnh quang trên máy fluorodensitometer

Fluorodensitometer có nhiều tiến bộ hơn, chính xác hơn so với nhìn bằng mắt thường. Tuy nhiên, ở nhiều phòng thí nghiệm hiện đại vẫn sử dụng phương pháp nhìn so sánh trực tiếp các vết trên bản mỏng vì dễ hơn nhiều khi phải qua máy densitometre.

Hội hóa học phân tích (A.O.A.C - 1980) đã lưu ý tới phương pháp phân tích định lượng sử dụng TLC. Phương pháp này mở rộng thành chương trình phân tích mẫu của tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới (International Agency for Research on Cancer)

(Friesen, 1980, 1982). Các kết quả của chương trình phân tích trên đã chứng minh sự thiếu chính xác của phân tích bằng TLC vì sai số rất cao (từ 30-122%).

Hiện có 4 phương pháp phân tích bằng TLC, phổ biến nhất là CB (Contamination Branch), BF (The Best Foods), EEC (The European Economic Community) và Pon's (Pons Methods). Phương pháp CB tỏ ra ưu điểm hơn cả và thường xuyên được sử dụng. Tuy nhiên phương pháp CB đắt, sử dụng quá nhiều dung môi phân tích. Phương pháp BF có tính thực tế hơn nhiều, dễ làm và tiêu thụ ít dung môi; dung môi sử dụng là nước và methanol ít độc hơn chloroform. Phương pháp của Pons có nhiều ưu điểm, sử dụng hệ dung môi là axeton và nước, dung môi này không hòa tan mỡ.

Cả 4 phương pháp trên đều sử dụng hệ dung môi chạy là chloroform và axeton.

Khẳng định sự có mặt của aflatoxin:

Một số chất được tách ra từ mẫu đôi khi dễ nhầm lẫn với aflatoxin, dẫn đến sự khẳng định sai lệch. Phương pháp khẳng định sự có mặt của aflatoxin trực tiếp thực hiện trên các bản sắc ký. Dựa vào sự biến đổi của aflatoxin thành các đồng phân có màu huỳnh quang khác so với huỳnh quang ban đầu, cả aflatoxin chuẩn và aflatoxin có trong mẫu phân tích đều chuyển sang có cùng một đồng phân. Thử nghiệm khẳng định sự có mặt của aflatoxin trong mẫu phân tích được phát hiện bởi Przybylski (1975) và Verhulsdonk (1977) (Dẫn theo Đậu Ngọc Hào, 2003) và được hội phân tích hóa học Hoa Kỳ (A.O.A.C) công nhận. Aflatoxin B_{2b} nhờ axit trifloaxetic (TFA) phun trực tiếp trên các bản mỏng. Axit sunfuric 50% được sử dụng để phun trực tiếp lên các bản mỏng trước khi chạy trong môi trường chạy. Axit sunfuric làm thay đổi màu huỳnh quang xanh da trời của aflatoxin B₁ thành màu vàng. Thử nghiệm này nhằm khẳng định sự không có mặt của aflatoxin nếu vết nghi ngờ không chuyển thành màu vàng.

2.4.1.2. Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (High performance thin layer chromatography - HPTLC)

Do những khiếm khuyết trong phương pháp sắc ký lớp mỏng đơn thuần ở các khâu như chiết tách mẫu phân tích, chạy mẫu trong dung môi, phương pháp HPTLC có tính thuyết phục cao hơn ở 3 khía cạnh sau: (1) Đưa mẫu lên bản mỏng một cách tự động; (2) Cải thiện được sự đồng nhất cả lớp hấp thụ; (3) Chạy bản mỏng trong dung môi có kiểm soát.

Quá trình đưa mẫu vào bản mỏng được tự động hóa, do đó, các vết được định đúng vị trí và đo cường độ huỳnh quang của vết cũng bằng máy densitometers. Thể tích mẫu được dùng trong HPTLC có thể = 1μl so với 5-10 μl mẫu trong phương pháp TLC, như vậy sẽ làm giảm đi rất nhiều diện tích của vết (=1mm). Nồng độ chất chuẩn có thể chỉ cần 5pg trong phân tích bằng HPTLC, do đó có thể xác định tới 30pg (0,03μg) aflatoxin B₁ ở lạc (Coker,19).

Sử dụng kỹ thuật HPTLC làm tăng tính thuyết phục của phương pháp TLC để định lượng aflatoxin có hiệu quả nhất.

2.4.1.3. Phương pháp sắc ký lỏng cao áp (High performance liquid chromatography - HPLC)

Hệ thống phân tích aflatoxin tự động HPLC là hệ thống phân tích đắt tiền, dùng xác định định lượng aflatoxin. Phương pháp HPLC sử dụng cả hai pha: Pha bình thường và pha phản. Hệ thống này dựa trên sự hấp thụ tia UV và xác định cường độ huỳnh quang. Trong pha bình thường, pha tĩnh là rắn, phân cực hơn pha động. Trong pha phản, pha bình thường là pha phản pha, pha tĩnh là lỏng và ít phân cực hơn pha động. Trong HPLC, pha phản được sử dụng để tách aflatoxin nhiều hơn pha bình thường.

Mẫu phân tích được tách bằng hỗn hợp chloroform với nước. Ly tâm chất tách và làm sạch qua Silica gel. Pha bình thường sử dụng cột nhồi Silica gel 5 μ m và pha động sử dụng: (benzen: axetonitril: axit formic). Giới hạn xác định là 0.5 μ g/kg. Các nhà khoa học đã sử dụng pha phản kết hợp với TFA đồng phân để xác định được các aflatoxin trong lạc. Sử dụng pha phản với sự hình thành các đồng phân có thể xác định được các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ ở nồng độ 5pg.

Davis (1980) cũng sử dụng pha phản để xác định huỳnh quang của đồng phân Iod của aflatoxin B₁. Kết quả dẫn đến việc phát triển phương pháp đồng phân cột.

2.4.1.4. Phương pháp cột mini (Minicolumn methods)

Phương pháp cột mini nhằm xác định nhanh aflatoxin có trong mẫu. Phương pháp này đơn giản, ít tốn kém, nhưng chỉ xác định định tính.

Kỹ thuật cột mini là cột sắc ký bằng thủy tinh hay chất dẻo có kích thước khoảng 3 - 6 mm chiều rộng và 20cm chiều dài. Dung dịch chiết tách được làm sạch bằng dung môi/dung môi và hòa tan trong một lượng nhỏ benzen hay chloroform. Cột được nhồi silica gel như một chất hấp thụ và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại (UV) để xác định màu huỳnh quang xanh chỉ ra sự có mặt của aflatoxin.

Các nhà khoa học đã cải tiến phương pháp này nhằm phát hiện nhanh aflatoxin trong mẫu. Phương pháp cột mini đã được A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists) (1980) công nhận. Aflatoxin được tách bằng axeton và nước (85:15), các chất tạp được loại trên gel cacbonat đồng và chloric sắt. Sau đó, aflatoxin được tách ra bằng một pha nước với chloroform. Chloroform tách được đưa vào cột có chứa một lớp bột nhôm trung tính, silica gel và florisil ở phía dưới, sunfat canxi khô ở cả trên và dưới. Cột được chạy trong chloroform và axeton (9:1) để giữ aflatoxin trên đỉnh của lớp florisil. Ở đó, aflatoxin có thể được xác định bởi màu huỳnh quang xanh dưới đèn tử ngoại.

2.4.2. Phương pháp hóa sinh miễn dịch (Immunochemical methods)

Phương pháp hóa sinh miễn dịch mang tính đặc hiệu cao, dựa trên nguyên lý kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu. Hai phương pháp hiện dùng là: Aflatoxin đánh dấu phóng xạ (radio-labeled aflatoxin) và aflatoxin gắn men. Do sự tiến bộ của kỹ

thuật miễn dịch trong những năm qua, đã phát triển nhiều hệ thống ELISA khác nhau để xác định aflatoxin và kháng thể đơn và đa dòng (monoclonal và polyclonal). Phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng (monoclonal) tỏ ra đặc hiệu với aflatoxin B₁ và aflatoxin B₂ (100 - 125%), với aflatoxin G₁ tới 30%. Trong khi đó kháng thể đơn dòng tỏ ra đặc hiệu với aflatoxin B₁ và không phản ứng chéo với aflatoxin G₁. Tuy nhiên, cũng có ý kiến cho rằng kháng thể đơn dòng có phản ứng chéo với aflatoxin B₂, G₁, G₂.

Theo ý kiến một số tác giả ở nhiều nước, việc xác định 4 loại aflatoxin B₁, B₂ và G₁, G₂ có mặt trong tự nhiên mang tính thực tiễn hơn là chỉ xác định aflatoxin B₁. Do vậy dùng kháng thể đa dòng hay đơn dòng để xác định aflatoxin không trở nên cần thiết.

2.4.2.1. Phương pháp ELISA (enzyme - linked immunoabsorbant assay)

Phương pháp ELISA gồm ELISA trực tiếp (direct) và ELISA gián tiếp (indirect).

ELISA trực tiếp sử dụng aflatoxin gắn men (aflatoxin - enzyme conjugate), ELISA gián tiếp - aflatoxin gắn protein (aflatoxin - enzyme conjugate) và một kháng thể thứ hai (secondary antibody) như IgG kháng thể (anti rabbit IgG). Cả hai phương pháp trực tiếp hay gián tiếp đều sử dụng men peroxidaza (HRP) và men photphataza kiềm để gắn.

ELISA trực tiếp (direct competitive ELISA)

Phương pháp ELISA trực tiếp dựa trên nguyên lý kháng thể đặc hiệu được phủ trên các đĩa chuẩn độ (microtiter). Dung dịch tách từ mẫu hay aflatoxin chuẩn được ủ cùng nhau hay tách thành 2 bước. Sau đó rửa bằng dung dịch thích hợp. Lượng men gắn vào đĩa được xác định bằng dung dịch đặc biệt. Phản ứng màu được đo bằng quang phổ hoặc so sánh bằng mắt thường với các đĩa tiêu chuẩn.

Phương pháp ELISA này nhiều khi cũng chiếm thời gian và sai số lớn trong cùng một mẫu phân tích do sự xâm nhập của các chất ngoại lai có trong mẫu tách. Chu và cộng sự (1978) đã phát triển một phương pháp đơn giản hơn, chỉ cần một giờ là có thể phát hiện được aflatoxin B₁ trong lạc và ngô, dựa trên nguyên lý chiết mẫu bằng methanol và nước có chứa dimethyl formamid. Bằng phương pháp này có thể phát hiện tới 95,4% aflatoxin B₁ trong bơ. Có thể làm tăng độ chính xác của phương pháp ELISA qua các bước làm sạch mẫu. Vì vậy, người ta đề nghị cần làm sạch mỡ trước khi đưa vào phản ứng ELISA.

ELISA gián tiếp (indirect ELISA)

Trong phương pháp này aflatoxin gắn vào protein được phủ các đĩa chuẩn độ (microtiter). Mẫu tách hay aflatoxin chuẩn được đưa vào đĩa, tiếp theo là kháng thể thứ cấp (anti aflatoxin antibody). Lượng kháng thể gắn vào đĩa được xác định do thêm IgG kháng thể (anti rabbit IgG) gắn với photphataza kiềm (ALP) và phản ứng màu xảy ra với P - nitrophenyl photphat. Lượng độc tố được xác định bằng cách so sánh với đường chuẩn (Standard Curve). Toàn bộ quá trình chiếm khoảng 5 giờ. Kawamura (1988) đã cải tiến phương pháp và xác định aflatoxin trong thời gian 3,5 giờ, độ nhạy phản ứng là 1ppb. So sánh với phương pháp ELISA trực tiếp, phương pháp ELISA gián tiếp trải qua

nhiều bước hơn và cần một kháng thể thứ cấp, vì vậy khả năng sai số cao và mất nhiều thời gian.

2.4.2.2. Phương pháp kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) trong phân tích ELISA

Do sự không đặc hiệu của phân tích ELISA trong quá trình sản xuất thể đa dòng (polyclonal antibody) trên thỏ, người ta đã sản xuất kháng thể đơn dòng nhằm mục đích loại bỏ sự thiếu chính xác do phản ứng chéo (crossreaction) giữa các aflatoxin với nhau, đặc biệt là aflatoxin B₁ và G₁.

Nguyên lý của sản xuất kháng thể đơn dòng:

Đây là phương pháp phức tạp. Kháng thể đơn dòng (McAb) được sản xuất sau khi pha trộn tế bào myeloma của chuột nhắt trắng với tế bào lách phân lập từ tế bào lai F1, được miễn dịch bằng aflatoxin B₁ (oxime - conjugate). Dòng tế bào lai hybridoma sản sinh kháng thể đặc hiệu chống aflatoxin B₁ mọc trên môi trường nuôi cấy tế bào. Dịch nuôi cấy thu được có hàm lượng chuẩn độ cao (1:800.000) bằng phương pháp phân tích enzym miễn dịch và được gắn men peroxidaza conjugate theo 2 bước với glutaraldehyd. Conjugate được sử dụng cho phân tích ELISA trực tiếp với aflatoxin B₁. Độ nhạy cảm của phương pháp đạt 0,2 ng/ml. Tính đặc hiệu của phương pháp đã được ghi nhận là không có phản ứng ngưng kết chéo với bất kỳ đồng phân nào. Phương pháp này cũng được ứng dụng để xác định aflatoxin B₁ trong thức ăn chăn nuôi và thực phẩm.

Bảng 2.5. Phản ứng ngưng kết chéo giữa các aflatoxin và đồng phân trong monoclonal antibody ELISA

Đồng phân Aflatoxin	Tỷ lệ % phản ứng chéo
Aflatoxin B ₁	100
Aflatoxin G ₁	14,3
Aflatoxin B ₂	12,5
Aflatoxin M ₁	7,3
Aflatoxin M ₂	4,4
Aflatoxin G ₂	1,8
Aflatoxin G _{2a}	0,08
Aflatoxin G _{2b}	0,03

Nguồn: Caudish, 1985

2.4.2.3. Kit ELISA thương phẩm

Một số các hãng của Anh, Pháp, Nhật Bản và Mỹ đã sản xuất ra các kit ELISA để phân tích aflatoxin. Trừ “Biokit” là ELISA gián tiếp, còn lại các kit khác đều là trực tiếp (bảng 2.6).

Bảng 2.6. Các kit ELISA thương phẩm để phân tích aflatoxin

Đặc tính	Quntitor	Aflasure (UK)	Biokit (UK)	Trasnia (France)	Afla - Check (Japan)
Đặc hiệu	B ₁	B ₁ , B ₂	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	B ₁
Bước sóng hấp thụ	450nm	450nm	414nm	410nm	492nm
	2 - 30	2 - 200	2 - 200	1 - 30	2 - 40
Giới hạn định lượng (ppb)	(Methanol:nước) (55:45)	(Axetonitril:nước) (60:40)	(Axetonitril:nước) (50:50)	(Methanol:nước) (80:20)	(Methanol:nước) (55:45)
Dung dịch chiết					

Nguồn: Dẫn theo Đậu Ngọc Hào, 2003

Các kit ELISA được sử dụng đơn giản, nhanh chóng và thích hợp ở lượng aflatoxin 20ppb.

Một vài dịch chiết được nhỏ lên giấy trên bản plastic. Nhỏ tiếp aflatoxin đã gắn men, sau đó cho dung dịch chất hiện màu. Sự không xuất hiện màu cho thấy sự có mặt của aflatoxin trong các mẫu chiết tách. Màu xanh sáng là không có 1 aflatoxin. Phương pháp chỉ mang tính chất định tính, không có ý nghĩa định lượng. Hạn chế của phương pháp này là giá kit còn cao, chỉ phù hợp cho kiểm tra sản phẩm xuất nhập khẩu và các chương trình giám sát aflatoxin. Cần được hoàn chỉnh và giảm giá do tự chế tạo để phục vụ cho sản xuất.

2.4.3. Phương pháp phân tích nhanh hàm lượng aflatoxin trong ngô (phương pháp BGYF)

Theo một trình tự phân tích trong phòng thí nghiệm đòi hỏi phải có thời gian và rất tốn kém tài chính. Vì vậy, người ta đã tìm ra nhưng phương pháp đơn giản hơn nhằm đáp ứng được đòi hỏi trong quá trình mua bán trên thị trường.

Phương pháp sử dụng cột mini (mini column) cũng là một trong các phương pháp xác định nhanh aflatoxin trong ngô, tuy nhiên độ chính xác kém vì dung lượng mẫu sử dụng trong quá trình này quá ít nên phương pháp này không được sử dụng rộng rãi.

Hiện nay người ta sử dụng kỹ thuật BGYF (bright green yellow fluorescences), kỹ thuật này dựa trên sự phát sáng của đèn huỳnh quang màu vàng xanh của các hạt bị nhiễm aflatoxin dưới ánh sáng đèn tử ngoại 365nm. Kỹ thuật này được gọi là phương pháp sàng lọc (screening) nhằm phát hiện nhanh lô hàng có hàm lượng aflatoxin thấp. Nếu kiểm tra khoảng 4,54kg mẫu mà không thấy có hạt màu vàng xanh, lô hàng được coi như có hàm lượng aflatoxin thấp. Nếu như có những hạt có màu huỳnh quang vàng xanh thì cần được đánh giá theo những thang mẫu quy định.

Ở Mỹ người ta chấp nhận phương pháp BGYF để đánh giá tình trạng nhiễm aflatoxin trong lô hàng hóa có hàm lượng từ 20 - 100ppb. Phương pháp này cũng được áp dụng ở nhiều nước và quy định mức nhiễm aflatoxin từ 20ppb trở lên tùy theo mục đích sử dụng.

Phương pháp BGYF cũng được áp dụng với ngô trắng và ngô đã qua bảo quản nhưng phương pháp này gặp khó khăn trong việc định lượng.

2.4.4. Các bước dẫn tới sai sót trong quá trình phân tích định lượng aflatoxin

Do sự phân bố hàm lượng aflatoxin không đồng đều trong lô phân tích, đặc biệt đối với lô hàng ở dạng hạt như ngô, hạt bông, lạc... Các loại hạt này có thể bị mốc hoặc bị sâu mọt nên có chứa hàm lượng aflatoxin cao hơn so với các hạt khác. Số lượng hạt bị mốc hay sâu mọt có khi tập trung vào những khu vực nhất định như trên bề mặt, trong các khu vực bị rò rỉ... Vì vậy sẽ gây ra những chênh lệch về hàm lượng đôi khi rất lớn trong cùng một lô hàng phân tích. Bên cạnh đó khi lấy mẫu người ta vẫn có thể bị áp đặt tính chủ quan và vì vậy cũng là nguyên nhân dẫn đến sự sai lệch kết quả phân tích. Đã có những công trình nghiên cứu cho thấy sự biến động hàm lượng aflatoxin có thể từ 0 - 500ppb do sự có mặt hay không có mặt của hạt bị mốc. Như vậy, nếu muốn tăng cao tính chính xác của kết quả phân tích với hàm lượng có thực trong lô hàng thì quá trình lấy mẫu cần phải được thiết kế và nghiên cứu. Sự sai sót có thể bắt đầu lấy mẫu từ lô hàng cho tới khi mẫu đó chỉ được lấy với một lượng nhỏ hơn để đem nghiền ra và lại một lần nữa, từ một khối lượng nhỏ này lại chỉ lấy một lượng rất nhỏ để phân tích. Cuối cùng sai sót còn tồn tại trong quá trình xử lý, chiết tách mẫu và đánh giá, đo lường mẫu trong các phương pháp.

Để khắc phục tình trạng trên, người ta đã thiết lập những chương trình phân tích mẫu để nghiên cứu nhằm giảm tối thiểu quá trình dẫn đến sai sót. Theo phương pháp phân tích và đánh giá của Hội phân tích hóa học Hoa kỳ (A.O.A.C) thì không thiết kế dung lượng mẫu bắt buộc, song bắt buộc mẫu phải được nghiền nhỏ tới kích thước quy định. Lần đầu tiên mẫu phải được nghiền để qua được rây số 20. Sau cùng 50g mẫu được sử dụng cho chiết tách và dùng cho phân tích.

Quá trình dẫn đến sai sót trong phân tích có thể được thiết lập và biểu diễn như sau:

$$V = S + C + F + Q$$

$$S = 3,9539 P/W_s$$

$$C = 0,1196 P/W_c$$

$$F = 0,0125 P/W_f$$

$$Q = 0,0699 p^2/N_q$$

Trong đó: V: là biểu diễn tổng các sai sót có thể

S: là sai sót trong quá trình lấy mẫu từ lô hàng

C: là sai sót từ quá trình lấy mẫu từ mẫu ban đầu

F: là lần lấy mẫu cuối cùng từ C

Q: là sai sót trong các bước xử lý mẫu

W_s: khối lượng mẫu lần đầu từ lô hàng (kg)

W_c: khối lượng mẫu lấy ra để nghiên từ W_s (kg)

W_f: khối lượng mẫu cuối cùng lấy từ W_c dùng để phân tích (kg)

N_q: số lần aflatoxin phải thông qua các công đoạn chiết tách để sử dụng cho phân tích cuối cùng.

P: là hàm lượng aflatoxin trong lô hàng phân tích bằng ppb hay µg/kg.

Kết quả của các công thức 2, 3, 4 là dựa trên những phân tích chi tiết trong phòng thí nghiệm với dung lượng mẫu cho cả 3 lần đã được tính toán và ước lượng cả những sai sót trong khi lấy mẫu để khắc phục tính chủ quan. Chỉ có thể có sự đồng nhất hàm lượng aflatoxin có trong hạt mới hy vọng khắc phục được sai sót do 2, 3 và 4. Nhưng điều đó không xảy ra trong thực tế.

Công thức 5 phản ánh sự sai sót trong các bước phân tích. Thông thường qua các bước làm sạch mẫu, sử dụng các dung môi phân tích để chiết tách có thể dẫn tới làm sai sót hàm lượng aflatoxin trong mẫu. Sự đánh giá bằng mắt thường trên bản mỏng theo phương pháp phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) cũng thường dẫn đến sự sai sót do tính chủ quan. Ngay cả nếu sử dụng máy đo mật độ quang học Spectro - photometer cũng vẫn tồn tại những sai sót khi đánh giá kết quả trên bản mỏng. Chỉ có sử dụng các phương pháp hiện đại hơn như sắc ký lỏng cao áp (HPLC) thì mới hy vọng làm giảm sai sót trong bước đánh giá cuối cùng.

Như thế chỉ có thể giảm thiểu sự sai sót trong phân tích định lượng aflatoxin khi các yếu tố có thể gây sai sót trong toàn bộ quá trình lấy mẫu và phân tích mẫu được chú ý và được tính toán tối ưu. Mỗi quan hệ giữa dung lượng mẫu, số lượng hạt đại diện được dùng trong phân tích và độ mịn của mẫu cuối cùng được đưa vào chiết tách là rất quan trọng. Điều này sẽ quyết định mức độ tương quan giữa kết quả phân tích với hàm lượng có trong lô phân tích.

Tuy nhiên nếu yêu cầu về mối tương quan càng cao thì chi phí cho quá trình phân tích càng lớn. Nói chung dung lượng mẫu càng cao, tỷ lệ hạt càng lớn trong quá trình

phân tích, đảm bảo mức chính xác và mối tương quan càng lớn, song chi phí quá cao sẽ cản trở công việc trên. Vì vậy các bước lấy mẫu phân tích cần được tính toán để đảm bảo sự phù hợp với khối lượng của lô hàng hóa phân tích.

2.5. Các phương pháp phân hủy aflatoxin

2.5.1. Phương pháp vật lý học

a) Phân hủy aflatoxin bằng không khí nóng

Phương pháp dùng không khí nóng thổi qua nguyên liệu có chứa aflatoxin để làm giảm thiểu lượng aflatoxin đã được nghiên cứu và phương pháp này cũng đã đem lại kết quả đáng kể. Ở lạc hạt, nếu sức nóng 130°C trong vòng 5 phút có thể làm giảm lượng aflatoxin B₁ từ 2000ppb xuống 1000ppb. Lượng aflatoxin giảm còn liên quan đến sự có mặt của các aflatoxin khác như af. B₂, af. G₁ v.v... Kết quả một số thí nghiệm cho thấy aflatoxin B₁ giảm 70% còn lượng aflatoxin B₂ chỉ giảm từ 47-52%. Trong các thí nghiệm khác lại thấy aflatoxin B₁, giảm được 69% và aflatoxin G₁, chỉ giảm 67%.

Trong nông nghiệp thường dùng phương pháp này để làm khô và giảm aflatoxin ở ngô hạt. Nếu nhiệt độ khí nóng là 100-145°C thì lượng aflatoxin B có thể giảm từ 877ppb còn 452ppb, từ 378 còn 213ppb, từ 133ppb còn 80ppb và từ 80ppb còn 35ppb (giảm khoảng từ 40% đến 60%). Nếu tăng nhiệt độ thổi lên tới 165°C có thể làm cho lượng aflatoxin B₁ giảm từ 66-77%.

b) Phân hủy aflatoxin bằng hấp ướt ở áp suất cao

Phương pháp hấp ướt ở nhiệt độ cao dưới áp lực hơi nước đem lại kết quả khả quan hơn. Quá trình này phá vỡ nhanh chóng vòng lactam trong cấu trúc phân tử aflatoxin. Coomes (1966), Elkady (1981) và một số tác giả đã chứng minh lượng aflatoxin có thể giảm thiểu tới mức không thể phát hiện được bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Ở lạc có độ ẩm 10%, chứa 7000ppb aflatoxin B₁; được hấp ướt ở 120°C trong 4 giờ, lượng aflatoxin B₁ đã giảm còn 370ppb. Ở hàm lượng aflatoxin thấp (760ppb) được hấp ở 1,5atm trong vòng 1 giờ đã phân hủy hoàn toàn aflatoxin.

Nếu gạo nhiễm aflatoxin từ 40-4000ppb được hấp ướt trong 5 phút ở 120°C (thêm nước vào gạo tỷ lệ là 1:4) có thể làm giảm hàm lượng aflatoxin B₁ tới 68%.

c) Phân hủy aflatoxin bằng cách đun trực tiếp

Aflatoxin bền vững với nhiệt độ. Điều này cũng phù hợp với nhiệt độ nóng chảy của các aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ và M lần lượt là 268, 386, 244, 230 và 299°C (Milczewski, 1981)

Nhiều thí nghiệm khác được tiến hành bằng phương pháp đun nấu thông thường (nhiệt độ = 100°C), song kết quả cho thấy hoàn toàn không giảm được lượng aflatoxin có trong mẫu phân tích. Khi đun sôi nguyên liệu nấu bia ở 100°C vẫn tìm thấy 90% lượng aflatoxin so với lượng độc tố có mặt ban đầu. Người ta đã phát hiện thấy trong thức ăn nấu chín ở Thái Lan một lượng aflatoxin từ 748ppb tới 1299ppb.

Tuy nhiên, độ bền vững của aflatoxin trong quá trình đun sôi còn phụ thuộc vào hàm lượng nước chứa trong hạt. Nếu luộc gạo với nước theo tỷ lệ 1:4 trong vòng 30 phút đã làm giảm 50% lượng aflatoxin. Nếu tỷ lệ đó là 1:8 giảm tới 67% lượng độc tố. Như vậy, trong quá trình đun sôi, nếu thêm nước vào sẽ thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy aflatoxin. Ranh giới nhiệt độ để phân hủy được aflatoxin cũng rất quan trọng. Nếu nhiệt độ nhỏ hơn 100°C thì khả năng phân hủy độc tố hầu như không xảy ra. Người ta đã ngâm hạt bông có độ ẩm 20% trong 90 phút ở nhiệt độ 60°C nhưng lượng aflatoxin B₁ không bị giảm đi, lượng aflatoxin B₁ và G₂ chỉ giảm được từ 1,7% và 2,8%.

Sự giảm aflatoxin trong điều kiện đun nấu còn phụ thuộc vào pH của mẫu phân tích. Nếu ở pH = 1, nhiệt độ ngâm là 40°C thì aflatoxin B₁ có thể chuyển thành aflatoxin B_{2a} và aflatoxin G₁ thành aflatoxin G_{2a}.

Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy, sự giảm aflatoxin M trong sữa chịu ảnh hưởng của nhiệt độ tiệt trùng. Nếu sử dụng nhiệt độ 75°C trong 4 giây, 62°C trong 30 phút, 74°C trong 30 phút thì tỷ lệ độc tố tương ứng giảm được là 12%, 35% và 40%. Tuy nhiên, bản thân sự phân hủy này còn phụ thuộc vào aflatoxin B, con vật ăn phải được đào thải qua sữa, hay thí nghiệm bổ sung aflatoxin M vào sữa. Những nghiên cứu khác cũng cho thấy, nếu hấp ướt bột lạc ở 1,5 atm, sau đó sấy khô ở 80-105°C thì bột lạc gần như đạt giới hạn an toàn cho vật nuôi.

Người ta đun nóng 500ppb aflatoxin trong dầu ở 160°C, sau 30 phút còn 400ppb độc tố. Tiếp tục đun 30 phút nữa aflatoxin vẫn không bị phá hủy. Dầu ngô và dầu lạc nhiễm aflatoxin được đun nóng tới 250°C mà độc tố vẫn tồn tại. Tuy nhiên sự giảm aflatoxin trong hạt lạc hay ngô bằng phương pháp sấy nóng có kết quả khả quan hơn. Nguyên do là bởi sự có mặt của nước trong các hạt. Nếu sấy lạc ở 160°C trong 30 phút thì lượng aflatoxin giảm từ 100ppb còn 5ppb, nếu ở 190°C trong 10 phút thì lượng độc tố còn lại là 20ppb.

d) Làm giảm aflatoxin bằng phương pháp hấp phụ

Aflatoxin có thể được hấp phụ bởi các chất hấp phụ như: vermicullit, montmorillonit, bentonit, sepiolit v.v... Nếu thử các chất hấp phụ trên ở hàm lượng 1 gam, thêm 50ml dung dịch đậm photphat (pH = 6), ủ trong 5 ngày thì khả năng hấp phụ aflatoxin có thể đạt 100%. Nghiên cứu sử dụng than gỗ hoạt tính để hấp phụ các mycotoxin trong đó có aflatoxin đã thu được kết quả tốt. Người ta đã tiến hành thí nghiệm trên 2 nhóm vật nuôi. Nhóm đối chứng ăn thức ăn nhiễm aflatoxin, thức ăn của nhóm thí nghiệm đã được hấp phụ qua than củi hoạt tính. Kết quả cho thấy nhóm vật nuôi đối chứng bị chết trong khi nhóm được ăn thức ăn qua hấp phụ vẫn khỏe mạnh.

Bên cạnh đó một số các hợp chất như silicagel, polyme cao phân tử cũng được thử nghiệm khả năng hấp phụ toxin trong thức ăn chăn nuôi. Quá trình hấp phụ xảy ra trên bề mặt các cao phân tử, do sự gắn các toxin vào các nhóm hydro. Các nhà nghiên cứu nhận thấy khả năng hấp phụ độc tố trong in vitro thí nghiệm với các độc tố chuẩn như

aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ giảm tới 61, 37, 46 và 35%. Kết quả được chứng minh qua việc nuôi vịt thí nghiệm. Người ta thấy những biểu hiện bệnh lý ở gan qua giải phẫu đã giảm rõ rệt nhưng vẫn phát hiện được những dấu vết của aflatoxin trong gan. Kết quả cũng được quan sát thấy trên gà thí nghiệm, trên lợn và gà đẻ. Các vật nuôi thí nghiệm phát triển bình thường và tăng trọng hơn so với đối chứng.

e) Tách aflatoxin bằng dung môi hữu cơ

Đây là phương pháp có thể áp dụng đối với thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là hạt lạc và hạt bông. Methanol được sử dụng như một dung môi thích hợp cho việc tách độc tố, ngoài ra còn có ethanol, axeton, cloroform, hỗn hợp axeton và nước, methanol và nước, hỗn hợp hexan - axeton - nước, v.v... Khả năng chiết xuất aflatoxin bằng các dung môi hữu cơ còn phụ thuộc vào nhiệt độ dung môi. Tuy nhiên mục đích chiết tách aflatoxin trong nguyên liệu còn cần được hạch toán kinh tế. Vì vậy chỉ dùng hỗn hợp methanol - nước là tương đối phù hợp về giá thành. Một thí nghiệm sử dụng methanol để tách aflatoxin ra khỏi ngô ở tỷ lệ 5: 1 đã cho kết quả rất khả quan. Gần như ngô đã trở nên vô độc đối với vịt, sau đó methanol thu hồi được lọc qua than hoạt tính và có thể tiếp tục sử dụng lại. Rửa các nguyên liệu chỉ chứa aflatoxin (như ngô) bằng dung dịch 1% clorua canxi (CaCl₂) có thể làm giảm tới 80% lượng aflatoxin. Nếu sử dụng nước có 1% bicacbonat natri (NaHCO₃), lượng độc sẽ giảm 100% (lượng ban đầu là 10 ppm). Tuy nhiên quá trình rửa cũng làm giảm hàm lượng protein tới 6%. Người ta có thể loại bỏ 80% aflatoxin trong dầu lạc bằng cách sử dụng nước muối 10% (NaCl) theo tỷ lệ 1:4 ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút.

f) Phân hủy aflatoxin bằng các tia xạ

Aflatoxin rất mẫn cảm với tia cực tím (UV light). Nhiều tác giả đã nghiên cứu khả năng làm giảm aflatoxin bằng tia cực tím. Ở bước sóng 365nm, khả năng hấp phụ của aflatoxin đạt cực đại. Lượng aflatoxin ở ngô (150ppb và 250ppb) có thể giảm 30% và 16% trong 10 giờ tiếp xúc với ánh nắng mặt trời. Các nhà khoa học ở Ấn Độ cũng khẳng định, dưới tác động của ánh sáng mặt trời aflatoxin B₁ trong bột lạc sẽ giảm từ 83% xuống 50%.

Các tia xạ như tia γ đã được nghiên cứu để làm giảm aflatoxin trong hạt. Thí nghiệm được tiến hành ở liều 1; 5; 10 và 15 Mrad (Mega rad) để chiếu vào các dung dịch có chứa aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂. Chỉ ở liều 10 Mrad mới có thể làm giảm đáng kể hàm lượng aflatoxin. Tuy nhiên, việc chiếu tia xạ để làm giảm aflatoxin trong nguyên liệu đã không mang lại ý nghĩa kinh tế. Nếu sử dụng liều 3 Mrad để chiếu vào thức ăn chăn nuôi đã làm giảm các chất dinh dưỡng, đặc biệt là các axit amin và cũng không gây nguy hiểm cho động vật thí nghiệm nuôi bằng thức ăn được chiếu tia xạ. Nhưng ở liều lượng này, aflatoxin đã không bị phá hủy. Nếu sử dụng liều 10 Mrad sẽ gây ảnh hưởng xấu đến các thành phần dinh dưỡng trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Từ các phương pháp vật lý nhằm phân hủy aflatoxin đã nêu trên, có thể nhận xét như sau:

Việc loại bỏ hoặc làm giảm lượng aflatoxin bằng phương pháp cơ học và vật lý học có thể mang lại những kết quả khả quan. Người ta tách bằng thủ công hay bằng các máy tách hạt những hạt bị hư hỏng, biến màu ra khỏi khối lượng hàng hóa để có thể tránh được một phần khả năng nhiễm aflatoxin.

Phương pháp phơi khô hay rửa bằng nước có chứa các dung môi hữu cơ không hoàn toàn loại bỏ được aflatoxin. Tuy nhiên, phương pháp này có ý nghĩa thực tiễn vì đơn giản dễ làm, đặc biệt đối với các nước nhiệt đới có nhiều ánh sáng mặt trời, điều kiện phơi khô thuận lợi. Nhưng hoàn toàn không phù hợp với các nguyên liệu đã xay nghiền từ hạt thành dạng bột.

Phương pháp chiết bằng các dung môi hữu cơ có thể lấy ra phần lớn lượng aflatoxin trong hàng hóa. Nó đã được áp dụng thành công ở nhiều nước và đặc biệt đối với bột lạc và dầu lạc.

Phương pháp hấp phụ qua than hoạt tính đặc biệt có hiệu quả đối với aflatoxin, patulin và các mycotoxin khác. Phương pháp làm vô hoạt độc tố nấm bằng nhiệt còn phụ thuộc vào các yếu tố như lượng nước có trong cơ chất, áp suất, thời gian và nhiệt độ sấy v.v..., trong đó hấp ướt dưới áp suất cao có hiệu lực hơn cả. Sự phân hủy các mycotoxin có thể xảy ra ở 100°C, thấp nhất là 60°C. *Citrinin* là độc tố nấm mốc dễ bị phân hủy bởi nhiệt, các độc tố khác như ochratoxin, patulin, zearalenon... lại tương đối bền vững với nhiệt. Aflatoxin là độc tố bền vững nhất ở nhiệt độ cao.

Aflatoxin có thể bị phân hủy bởi tia cực tím, thậm chí khi phơi nắng. Tia ion cũng có thể phân hủy được aflatoxin, tuy nhiên liều cần thiết là rất cao và do đó ảnh hưởng tới chất lượng của thực phẩm, thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi.

2.5.2. Phương pháp hoá học

Phương pháp hóa học sử dụng nhằm vô hoạt hay giảm lượng aflatoxin trong thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi đã được nhiều tác giả nghiên cứu và được ứng dụng ở nhiều nơi.

a) Phương pháp sử dụng các chất oxy hóa khử

Các chất oxy hóa khử như natri hypochlorit (NaOCl), oxy già (H₂O₂) được sử dụng để làm mất độc tính của aflatoxin. Natri hypochlorit được dùng làm sạch các dụng cụ phòng thí nghiệm. Người ta đã chứng minh khả năng làm vô hoạt aflatoxin B₁, có thể chuyển thành dạng aflatoxin B₁₋₂₋₃ dichlorid, là một chất rất nguy hiểm có thể gây ung thư và đột biến. Vì vậy, khi dùng NaOCl để khử aflatoxin B₁, thường kết hợp với axeton hàm lượng 5%.

Cũng có thể sử dụng hỗn hợp NaOCl và H₂O₂ để phân hủy aflatoxin. Người ta còn dùng hỗn hợp 16,5% NaCl và 1% NaOCl để xử lý mẫu. Thí nghiệm trên bột gạo được

xử lý bằng dung dịch trên trong 24 giờ đã tách được hoàn toàn aflatoxin ra khỏi mẫu thử. Khi mẫu được xử lý bằng dung dịch 3% H_2O_2 trong 1 giờ ở 65°C , lượng aflatoxin B_1 trong ngô giảm từ 379ppb còn 20ppb. Nhiều tác giả khác cũng cho biết, có thể loại bỏ hoàn toàn aflatoxin B_1 bằng hỗn hợp 2% NaOCl và 12% H_2O_2 ở điều kiện bình thường. Một số nghiên cứu khác sử dụng H_2O_2 trong 30 phút ở $\text{pH} = 9,5$ và 80°C cho kết quả rất khả quan, không những aflatoxin bị phân hủy hoàn toàn mà còn đảm bảo an toàn khi thí nghiệm lại trên vệt và trên phôi gà. Tuy nhiên sử dụng NaOCl để xử lý hạt nhiễm aflatoxin có thể làm mất màu sắc của hạt và biến chất các axit amin.

Khí ozon (O_3) cũng được thử nghiệm về khả năng phân hủy aflatoxin trong mẫu đạt hiệu quả tốt, song có bằng chứng là chất lượng các thành phần của thức ăn bị giảm, đặc biệt là protein.

b) Phương pháp sử dụng các chất kiềm

Hydroxit amon (NH_4OH) và hydroxit natri (NaOH) là 2 chất kiềm được thử nghiệm làm vô hoạt aflatoxin. Các chất này đều có hoạt tính mạnh, có thể phá vỡ vòng lactam trong cấu trúc phân tử aflatoxin. Tuy điều kiện thí nghiệm mà các sản phẩm phân hủy aflatoxin có những trọng lượng phân tử khác nhau. Người ta đã xác định được một số chất có trọng lượng phân tử 286 và 256. Aflatoxin D_1 , là sản phẩm phân hủy có trọng lượng phân tử bằng 286. Quá trình hình thành aflatoxin D_1 dưới tác động của ion NH_3 làm mở vòng lactam và làm mất cacbon của axit keto. Ở nồng độ nguyên của NH_4OH , trong 100°C và 1 giờ tiếp xúc đã có 10% aflatoxin D_1 , hình thành từ aflatoxin B_1 .

Schroeder (1968) đã lập mô hình thí nghiệm với aflatoxin đánh dấu nguyên tử hydro (3H-aflatoxin B_1) trong một thời gian tiếp xúc là 4 giờ ở 100°C và 25% NH_4OH thì có 31% aflatoxin B_1 , chuyển thành aflatoxin D_1 .

Hợp chất được phân giải có trọng lượng phân tử bằng 206 được phát hiện bị mất đi vòng lactam và vòng zylopentan. Một chất khác là sản phẩm phân giải tiếp theo của phân tử aflatoxin D_1 , do bị mất nhóm methoxy có trọng lượng phân tử là 256. Trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm, aflatoxin được tiếp xúc với NH_4OH đậm đặc trong 18 ngày đã phát hiện được những thành phần không bị hòa tan trong axeton nhưng không xác định được sản phẩm phân giải loại gì. Chất được xác định tiếp theo trong những thí nghiệm khác là axit o-cumaric.

Tuy tác dụng của các kiềm chất phân giải aflatoxin đã được chứng minh bằng sự mất màu xanh huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại (UV), song trên động vật thí nghiệm thì không an toàn. Điều này đã được kiểm tra với *Artamia salina* và tính đột biến trong thí nghiệm trên *Samonella* (Ames-test). Như vậy, độc tính của aflatoxin không chỉ phụ thuộc vào vòng lactam, mà còn phụ thuộc vào vòng furan trong phân tử. Theo nghiên cứu của Vesonder (1975), nếu thời gian tiếp xúc của aflatoxin với NH_4OH trong 18 ngày ở nhiệt độ 60°C , độc tố sẽ bị phân hủy hoàn toàn và không gây độc cho phôi trứng thử nghiệm. Nhưng theo Draughon (1982), dù tăng cường hàm lượng NaOH hay

NH_4OH , vẫn còn từ 6-10% aflatoxin B_1 , tồn lại trong sản phẩm thử nghiệm. Do vậy theo tác giả, cần thận trọng khi sử dụng các sản phẩm phân hủy toxin bằng con đường này nếu như trong nguyên liệu có chứa nhiều aflatoxin.

Ngoài ra, hydroxit canxi $\text{Ca}(\text{OH})_2$, natri cacbonat Na_2CO_3 cũng đã được thử nghiệm và cho hiệu quả cao. Trong những thí nghiệm khác, người ta còn kết hợp giữa monomethyramin và natri cacbonat.

c) Phương pháp sử dụng khí NH_3

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh hiệu quả hiển hiện của việc dùng khí NH_3 làm vô hoạt aflatoxin. Ngay trong thực tiễn ở nhiều nước, phương pháp này đã và đang được sử dụng.

Thí nghiệm trên hạt bông được xử lý bằng khí NH_3 cho thấy rất thành công, đặc biệt trong điều kiện nâng cao nhiệt độ và áp suất. Ở nhiệt độ 121°C và 1,5 atm chỉ trong 30 phút, hạt bông có chứa 317ppb và 545ppb aflatoxin B_1 đã giảm xuống còn 1 và 3ppb.

Để thuận tiện cho việc ứng dụng trong thực tiễn, những thí nghiệm trong điều kiện bình thường đã được áp dụng. Nếu hạt bông đựng trong các túi polyethylen kín chứa 2% khí NH_3 ở 43°C , hàm lượng độc tố có thể giảm từ 800ppb còn 200ppb. Ở điều kiện bình thường và áp lực bình thường, tác dụng của NH_3 phân hủy aflatoxin cần kéo dài tới 15 ngày. Nếu hàm lượng nước của vật liệu thấp (7,5%), tác dụng của NH_3 sẽ kém, vì vậy cần nâng độ ẩm cơ chất lên 15; 17 hoặc 20% để đạt hiệu quả tốt hơn.

Price (1982) đã xử lý 50 tấn hạt bông có độ ẩm bằng 17%, nhiễm 400-7000ppb aflatoxin B_1 , đựng trong các túi nhựa chứa 1,5% NH_3 ở nhiệt độ và áp lực bình thường, thời gian xử lý kéo dài 21 ngày. Kết quả phân tích mẫu sau khi xử lý cho thấy chỉ còn 20ppb aflatoxin B_1 được xác định.

Các nghiên cứu trên lạc và ngô cũng cho kết quả rất tốt. Cheelkowski (1981) đã thử nghiệm trên lạc chứa lượng aflatoxin bằng 1842ppb được tiếp xúc với 2% khí NH_3 ở nhiệt độ 43°C trong 5 tuần lễ, kết quả hầu như 100% aflatoxin bị phân hủy. Cũng theo tác giả trên, nếu nhiệt độ bên ngoài khoảng 30°C thì trong 11 tuần, lượng aflatoxin có trong lạc có thể giảm tới 95%.

Xử lý ngô hạt bằng khí NH_3 được đặc biệt quan tâm ứng dụng hơn cả. Người ta nhận thấy, nếu hàm lượng NH_3 là 0,5-1,5% và nhiệt độ bên ngoài là 25°C , trong 14 ngày tiếp xúc, lượng aflatoxin từ 200ppb có thể giảm xuống còn 10ppb. Tuy nhiên để có hiệu quả xử lý nhanh hơn và tiết kiệm hơn, phương pháp bơm khí luân chuyển (Recycle -Techniques) đã được sử dụng nhằm mục đích tăng tiếp xúc của khí NH_3 với nguyên liệu xử lý. Kết quả thí nghiệm như sau: nếu trong 14 ngày tiếp xúc, độ ẩm ngô hạt là 17,5% và nhiệt độ môi trường 25°C , độc tố trong ngô bị phân giải còn 10ppb từ 1000ppb ban đầu. Nhiều tác giả khác cũng khẳng định, nếu ngô bị nhiễm aflatoxin, đựng trong các túi chất dẻo chứa từ 1-1,5% khí NH_3 và để qua mùa đông chắc chắn sẽ có tác dụng tốt.

Việc áp dụng khí NH_3 để xử lý khối lượng ngô lớn cũng đạt được những hiệu quả tốt. Brekke (1977) đã xử lý 29 tấn ngô bị nhiễm tới 750ppb aflatoxin bằng 1,5% NH_3 theo phương pháp Recycling trong 13 ngày đã làm giảm lượng aflatoxin xuống còn 7ppb. Guthrie (1979) đã dùng phương pháp thổi khí NH_3 qua các túi đựng 380 tấn ngô bị nhiễm aflatoxin hàm lượng 272ppb trong 48 giờ. Kết quả hàm lượng aflatoxin chỉ còn 29ppb.

* Tính an toàn và ảnh hưởng của khí NH_3 đến giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu được xử lý.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, xử lý nguyên liệu nhiễm aflatoxin bằng khí NH_3 hoàn toàn không gây độc hại cho động vật thí nghiệm nuôi bằng thức ăn chế tạo từ nguyên liệu đó. Ngô nhiễm 1600ppb aflatoxin được xử lý bằng khí NH_3 đã không gây chết vịt và phôi trứng gà. Nếu đem ngô cho lợn ăn, không phát hiện thấy sự biến đổi bệnh lý ở gan. Những thí nghiệm trên gà cũng không thấy hệ thống miễn dịch bị ảnh hưởng do ăn thức ăn nêu trên. Bằng chứng còn được ghi nhận ở chuột và hoạt độ men photphataza kiềm không thay đổi. Bằng phương pháp phóng xạ đánh dấu cacbon (C_{14}) cũng nhận thấy rất ít sự kết hợp giữa aflatoxin B_1 với phân tử ADN trong tế bào gan gà được ăn thức ăn qua xử lý này. Cũng như các thí nghiệm trên, kết quả là hàm lượng aflatoxin M_1 trong sữa bò rất thấp.

Kết quả nghiên cứu đặc tính của các chất phân giải từ aflatoxin B_1 trong ngô cũng cho thấy chỉ những trường hợp hàm lượng độc tố ban đầu quá cao (hàng nghìnppb) mới gây nguy cho phôi trứng. Các hàm lượng toxin thấp (vài chụcppb) đã không thể hiện độc tính trên động vật thí nghiệm ăn thức ăn qua xử lý.

Khí NH_3 cũng làm thay đổi mùi vị và màu sắc của hạt, giảm hàm lượng cystin trong hạt. Nhưng vẫn có thể khắc phục bằng cách bổ sung thêm methionin vào khẩu phần thức ăn.

d) Phương pháp sử dụng formaldehyd, bisunfit và axit

Formaldehyd, bisunfit và axit cũng có thể phân giải được aflatoxin. Hàm lượng aflatoxin trong bột lạc được tiếp xúc với 2% formaldehyd ở 100-200°C đã hoàn toàn giảm. Tác dụng phân giải độc tố của formaldehyd còn mạnh hơn nếu kết hợp với hydroxit canxi $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Tuy nhiên, formaldehyd có tính độc hại đối với động vật nên người ta ít sử dụng.

Doyle (1978) đã thí nghiệm loại bỏ aflatoxin trong mẫu phân tích bằng dung dịch sunphit kali (K_2SO_3) 0,05M (tương đương với 3000 mg/kg SO_2) ở nhiệt độ 25°C và pH bằng 5,5. Kết quả 50% aflatoxin B_1 bị phân hủy trong thời gian 127-163 giờ. Nếu nâng nhiệt độ lên thì khả năng phân giải độc tố sẽ mạnh hơn. Aflatoxin B_1 trong ngô cũng bị phân hủy bởi NaHSO_3 , trong 24 giờ ở nhiệt độ 24°C. Ngoài ra, cũng có thể dùng bisunfit để xử lý aflatoxin trong sữa.

Khả năng phân hủy aflatoxin B_1 của bisunfit là do phá vỡ vòng lactam, còn ảnh hưởng của bisunfit và formaldehyd hạn chế độc hại aflatoxin đối với động vật thí nghiệm vẫn chưa được phát hiện.

Các axit có tác dụng biến đổi aflatoxin B₁ và G₁ thành aflatoxin B_{2a} và G_{2a}. Sự chuyển biến trên còn phụ thuộc vào độ pH và nhiệt độ dung dịch. Nếu pH bằng 3 và nhiệt độ dung dịch là 40°C thì quá trình trên xảy ra trong 214 giờ và làm biến đổi 95% aflatoxin B₁. Người ta cũng chứng minh được aflatoxin B_{2a} và G_{2a} rất ít độc đối với các động vật thí nghiệm như vịt và phôi gà so với aflatoxin B₁.

2.5.3. Phương pháp sinh học

Các loài nấm men, mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn đã được thử nghiệm về khả năng phân hủy aflatoxin.

Ciegler (1996) nhận thấy *Flavobacterium aurantiacum* có thể phân hủy hoàn toàn aflatoxin có trong mẫu phân tích. Chủng này còn được sử dụng để loại bỏ aflatoxin M₁ trong sữa, bơ, lạc, ngô. Các nguyên liệu này sử dụng làm thức ăn cho vịt đảm bảo an toàn.

Rhizopus stolonifer phân hủy được aflatoxin G₁. *Rhizopus arrhizus* có thể làm giảm chức năng ketone trong vòng cyclopentan của aflatoxin B₁ tạo thành chất ít độc hơn và xác định bằng phương pháp đánh dấu nguyên tử (C¹⁴).

Aspergillus parasiticus cũng có thể tác động lên aflatoxin qua hệ thống men của sợi nấm. Tuy nhiên, tác dụng này có sự phụ thuộc vào chủng loại nấm, nhiệt độ, độ pH và hàm lượng aflatoxin trong môi trường.

Corynebacterium rubrum và *Aspergillus niger* chuyển hóa aflatoxin B₁ thành aflatoxin R₀. *Tetrahydema pyriformis* làm giảm 58% aflatoxin B₁ trong thời gian nuôi cấy 24 giờ và 67% trong 48 giờ.

Hiện nay, đã chọn được một số dạng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có tác dụng hạn chế ảnh hưởng xấu của aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi. Đã có một số chế phẩm được sản xuất từ chủng này như chế phẩm Yea-sac của hãng Agritech Sài Gòn (Bayer).

Bộ môn Vệ sinh thú y - Viện Thú y quốc gia cũng sử dụng một số dạng nấm men dưới dạng bào tử sống bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, rất thuận tiện cho sử dụng. Các chế phẩm này không những hạn chế được tác dụng xấu của aflatoxin mà còn giúp tăng trọng và giảm bệnh đường tiêu hóa ở vật nuôi.

Những chế phẩm sinh học rất đáng được quan tâm sử dụng vì giá thành rẻ, sử dụng thuận tiện, có lợi cho sản xuất, tạo ra thực phẩm sạch, bảo đảm sức khỏe và quyền lợi cho người tiêu dùng.

2.6. Sử dụng thức ăn chăn nuôi bị nhiễm aflatoxin

2.6.1. Hàm lượng aflatoxin tối đa trong thức ăn được sử dụng cho chăn nuôi

Các tổ chức quốc tế như: Tổ chức Nông nghiệp và thực phẩm thế giới (FAO), Tổ chức Y tế thế giới (WHO), khối thị trường chung châu Âu (EU), các nước trên phạm vi

thể giới đều đưa ra những giới hạn cho phép sự có mặt của aflatoxin trong lương thực, thực phẩm dùng cho người và gia súc.

2.6.1.1. Một số căn cứ và phương pháp để tạo lập hàm lượng giới hạn tối đa (hay giới hạn an toàn - MED)

Người ta quan tâm đến nhiễm độc aflatoxin trong chăn nuôi không chỉ vì aflatoxin làm thiệt hại về kinh tế cho người chăn nuôi đơn thuần mà còn do sự tồn dư của chất độc này trong sản phẩm vật nuôi, đặc biệt được chú ý đối với bò sữa. Nếu trong sữa có aflatoxin thì rất nguy hại cho trẻ em vì cơ thể chưa trưởng thành, kể cả gia súc non và trẻ em đều rất mẫn cảm với aflatoxin.

Người ta nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng aflatoxin có trong thức ăn và hàm lượng aflatoxin trong sữa bò và lợn cho thấy, nếu trong thức ăn có 100ppb aflatoxin B₁ thì trong sữa bò có 1,5ppb tồn dư; trong sữa lợn mẹ còn 8ppb. Qua nhiều thí nghiệm và các kết quả phân tích khác nhau, người ta đã đưa ra được tỷ lệ là 100:1 (1%) giữa hàm lượng aflatoxin trong thức ăn và trong sữa. Nhiều tác giả ở các nước khác nhau cũng đã nghiên cứu mối tương quan này trên các tổ chức như: gan, thận, thịt, trứng... của vật nuôi và đưa ra kết quả tỷ lệ: đó là 14.000:1 đối với thịt; 2200:1 đối với trứng; 1200:1 với gan gà; 800:1 với gan lợn và 300:1 với sữa bò. Tuy nhiên họ cũng kết luận rằng tỷ lệ trên không phải là một hằng số bởi vì sự hấp thu và thải trừ chất độc còn phụ thuộc vào cá thể con vật nuôi. Để đảm bảo được an toàn cho vật nuôi và sức khỏe người tiêu dùng, các nhà khoa học đã tìm cách xác định giới hạn an toàn hay liều an toàn tối thiểu viết tắt theo tiếng anh là: MED (Minimum Effective Dose). Nếu nghiên cứu liều này trên gà thì phải tới 2500ppb trong thức ăn mới gây chết ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Như vậy giới hạn an toàn phải nhỏ hơn 2500ppb. Điều này đã đặt ra những nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của aflatoxin tới các chức năng sinh lý và sinh hóa của vật nuôi. Ngay cả ở liều < 625 ppb thì vẫn ảnh hưởng đến hội chứng xanh tím và chảy máu ở cơ, sự giảm hàm lượng men lipaza tuyến tụy, tăng thời gian đông máu, do đó việc thiết lập giới hạn cần phải được nghiên cứu ở mức thấp hơn. Sáu liều khác nhau dưới 625ppb aflatoxin B₁ đã được lựa chọn và rút ra hai liều là 200 và 350ppb aflatoxin B₁ để nghiên cứu đánh giá. Các nhà khoa học đã rút ra mối quan hệ giữa liều lượng có tác dụng và sự biến đổi sinh hóa sinh lý là tỷ lệ 10:1. Như vậy để đảm bảo an toàn về chức năng sinh lý sinh hóa thì hàm lượng đó thực chất là từ 20-35ppb.

Tuy nhiên, nếu sử dụng thuật toán thống kê để nghiên cứu nhiều yếu tố cùng một lúc với hàm lượng aflatoxin ở các ngưỡng xác định thì thấy vẫn còn có yếu tố chưa phù hợp với sự xác định liều. Vì vậy trong mô hình nghiên cứu tiếp theo đã giảm hàm lượng từ 200-350ppb xuống còn 50-88ppb. Lý do còn là để không bị tách rời các yếu tố thống

kê đơn thuần khối yếu tố sinh học của cơ thể và ngoại cảnh của vật nuôi. Người ta phải mất tới 400 thí nghiệm để tính toán được sự giảm đi 1% năng suất thực sự của vật nuôi do tác dụng của aflatoxin. Nếu chỉ giảm đi 1% năng suất chăn nuôi do tác động của aflatoxin thì hàng năm nước Mỹ có thể thiệt hại tới hàng trăm triệu đôla trong công nghiệp chăn nuôi gia cầm.

Như vậy làm thế nào để tránh được thiệt hại trong chăn nuôi khi đề ra những hàm lượng cho phép aflatoxin có trong thức ăn, mà trong thực tế không thể loại bỏ hoàn toàn chất độc này. Thực sự nếu chỉ nghiên cứu trong phòng thí nghiệm hoàn toàn không đáp ứng được đòi hỏi của thực tế. Mẫu thí nghiệm đủ lớn mới phù hợp với thực tế sản xuất, khi đó phải có tới hàng nghìn gà cho một lô thí nghiệm. Và nếu có thực hiện được thì chắc chắn giới hạn đề ra phải nhỏ tới mức $< 1\text{ppb}$.

Do đó, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu hàng vạn gà ở tổ hợp chăn nuôi khác nhau nhưng có cùng điều kiện chuồng trại, công thức thức ăn, giống gà chỉ khác nhau về hàm lượng aflatoxin trong thức ăn. Họ rút ra kết luận là nếu như thức ăn có chứa 6ppb aflatoxin B₁ và tần suất nhiễm 18% được coi như là giới hạn an toàn và thức ăn được đánh giá là tốt. Nếu hàm lượng đó là 15ppb và tần suất nhiễm là 31% thì xem như không an toàn, thức ăn kém.

Kết hợp nhiều yếu tố trong nghiên cứu phòng thí nghiệm, các yếu tố sinh học cơ thể vật nuôi, người ta đi đến đề xuất một giới hạn MED là 10ppb aflatoxin B₁, đối với thức ăn của gia cầm và cũng như vậy người ta đề xuất giới hạn chất độc này cho lợn, bò và một số vật nuôi khác. Tuy nhiên cũng không thể có giới hạn nào tuyệt đối an toàn vì còn phụ thuộc rất nhiều vào yếu tố môi trường và các stress khác.

2.6.1.2. Quy định về hàm lượng aflatoxin tối đa trong thức ăn chăn nuôi

* Quy định của một số nước trên thế giới.

Quy định về hàm lượng aflatoxin tối đa có trong thức ăn chăn nuôi của Áo là 50ppb, của khối EEC bao gồm Bỉ, Đan Mạch, Đức, Ailen, Ý, Lucxămbua, Hà Lan, Anh, Hy Lạp là 50ppb trong thức ăn hỗn hợp cho bò thịt, lợn, gia cầm, 10ppb cho bò sữa, bê non, cừu non, trong thức ăn bổ sung cho bò sữa là 20ppb, của Ba Lan là từ 200ppb đối với tất cả các thức ăn chăn nuôi, tùy thuộc vào đối tượng vật nuôi. Hàm lượng aflatoxin tối đa trong lạc, khô dầu lạc dùng làm thức ăn chăn nuôi của Ấn Độ là 1000ppb, của Nhật Bản cũng là 1000ppb nhưng có lưu ý là không sử dụng trong thức ăn cho gà, bê, lợn, không dùng quá 2% trong thức ăn cho bò sữa và không quá 4% trong thức ăn cho các loại gia súc khác. Đối với thực phẩm cho người, các nước thường quy định hàm lượng tối đa aflatoxin là 10ppb cho tất cả các loại thực phẩm và 20ppb cho lạc và sản phẩm từ lạc.

* Quy định của Việt Nam

Quy định tạm thời của Việt Nam về hàm lượng aflatoxin tối đa trong nguyên liệu thức ăn và thức ăn hỗn hợp dùng cho chăn nuôi xem tại bảng 2.5.

Bảng 2.5. Quy định tạm thời về hàm lượng tối đa aflatoxin trong thức ăn và nguyên liệu thức ăn chăn nuôi ở Việt Nam

Nguyên liệu	Lượng aflatoxin B1 tối đa (ppb)	Tổng số aflatoxin B1 + B2 + G1 + G2 (ppb)
Khô dầu lạc nhân	250	500
Khô dầu lạc cả vỏ	100	250
Ngô hạt	100	150
Sắn khô	50	100
Khô đậu tương	100	200
Đậu tương	50	100
Cám gạo	50	100
Bột cá, bột xương	10	20
Thức ăn gà con (từ 1 - 21 ngày tuổi)	10	30
Nhóm còn lại	30	50
Thức ăn vịt con (từ 1 - 21 ngày tuổi)	5	10
Nhóm còn lại	10	20
Thức ăn lợn con (từ 1 - 60 ngày tuổi)	20	50
Nhóm còn lại	100	200
Bò nuôi lấy sữa	20	50

Nguồn tài liệu: Vụ KHKT và CLSP bộ nông nghiệp và PTNT

2.6.2. Những điều cần chú ý khi sử dụng thức ăn nhiễm aflatoxin

Thức ăn chăn nuôi không chỉ có riêng độc tố aflatoxin của nấm mốc *A. flavus* tiết ra mà còn có các độc tố của các nấm mốc khác như *A. ochraceus*, *Fusarium* sp., *penicillium* sp. Độc tố của các nấm mốc này cũng rất nguy hiểm đối với vật nuôi.

Tuy nhiên, cũng không nên quá sợ hãi về độc tố nấm mốc mà không sử dụng các nguyên liệu thức ăn đã nhiễm nấm mốc. Để gia súc không bị độc và không giảm năng suất chăn nuôi, khi sử dụng nguyên liệu có chứa độc tố aflatoxin cần chú ý những điểm sau:

*** Loại gia súc, gia cầm**

Các loại gia súc gia cầm khác nhau có sự mẫn cảm với aflatoxin khác nhau. Vì thế có thể sử dụng thức ăn cho các loại gia súc ít mẫn cảm với độc tố.

Ví dụ: Vịt rất mẫn cảm với aflatoxin, nhưng gà thì ít mẫn cảm hơn. Có thể sử dụng thức ăn nhiễm độc aflatoxin cao cho trâu, bò thịt, cày kéo, nhưng không được sử dụng cho trâu, bò sữa. Aflatoxin sẽ chuyển hóa thành aflatoxin M trong sữa, độc tố này rất độc hại đối với trẻ em nói riêng, con người nói chung, cũng không dùng thức ăn nhiễm aflatoxin cao cho gà và lợn.

*** Tuổi của gia súc, gia cầm.**

Cùng một loại gia súc, gia cầm nhưng ở các giai đoạn tuổi khác nhau thì sẽ mẫn cảm với aflatoxin khác nhau.

Ví dụ: Lợn ở giai đoạn vỗ béo ít chịu ảnh hưởng aflatoxin hơn là lợn con.

*** Hàm lượng aflatoxin trong thức ăn**

Các thức ăn nhiễm độc nhẹ aflatoxin có thể sử dụng cho gà, lợn, còn nhiễm độc cao có thể sử dụng cho trâu, bò vỗ béo, cày kéo. Vì thế, cần xác định hàm lượng độc tố trong thức ăn để sử dụng cho phù hợp với đối tượng vật nuôi.

*** Pha loãng nguyên liệu bị nhiễm aflatoxin cao**

Nguyên liệu nhiễm aflatoxin cao, thì nên đưa vào thức ăn hỗn hợp với tỷ lệ nhỏ hơn thông thường, như vậy thức ăn sau khi phối chế sẽ trở thành bị nhiễm aflatoxin với hàm lượng thấp. Thức ăn này sẽ được sử dụng cho đối tượng gia súc, gia cầm rộng hơn.

Các nghiên cứu cho thấy: Sử dụng đúng, hợp lý thức ăn nhiễm aflatoxin vẫn đạt được hiệu quả kinh tế cao vì nó không làm ảnh hưởng đến năng suất chăn nuôi, đồng thời còn làm giảm chi phí thức ăn (vì thức ăn nhiễm aflatoxin có giá rẻ hơn thức ăn không bị nhiễm aflatoxin).

2.7. Một số chế phẩm chống aflatoxin

2.7.1. Một số chế phẩm trong thương mại

Hiện tại trên thị trường Việt Nam, nhiều hãng sản xuất thuốc thú y và các chế phẩm sinh học đã giới thiệu và có bán các chế phẩm chống aflatoxin và mycotoxin khác nhau, có thể thấy một số chế phẩm như sau:

*** Biodone**

Biodone là sản phẩm của ISIA pacific Pte LTD.

Theo giới thiệu của hãng sản xuất thì Biodone không hòa tan trong nước, dạng bột màu trắng; trọng lượng phân tử >1.000.000.

Cơ chế hấp phụ mycotoxin hay aflatoxin dựa vào khả năng gắn kết của aflatoxin lên bề mặt của các phân tử Biodone, bề mặt rất rộng giống như kiểu Kiesलगुर (hyflo supper eel) với tỷ lệ 20:80 mà hoạt lực gắn các mycotoxin. Mycotoxin đã được gắn vào Biodone sẽ được loại ra khỏi thức ăn qua phân.

Liều sử dụng là 200 ppm (tức là 200g trên một tấn thức ăn). Có thể trực tiếp trộn vào thức ăn trước khi cho ăn, hoặc cho gia súc uống trực tiếp chế phẩm này.

*** Alvefix plus**

Alvefix plus của hãng Avetra GmbH (Hà Lan) là chế phẩm chống aflatoxin. Theo giới thiệu của hãng thì Alvefix plus bao gồm 3 thành phần:

Vitamin E (10.000mg)

Selenium (160mg dưới dạng Sodium selenite)

Processed silicates (Silicat đã được xử lý)

Alvefix plus được đưa vào thức ăn nhằm giảm tác hại của các độc tố nấm mốc. Do có hoạt tính gắn chặt với các độc tố như aflatoxin đã làm cho chúng không thể đi vào máu gây độc mà được đào thải ra ngoài theo phân. Sử dụng Alvefix plus ở hàm lượng 2kg/tấn thức ăn cho gà dò ở 4 tuần đầu, sau đó là 1kg/tấn thức ăn ở giai đoạn sau.

Đối với gà đẻ trứng liều Alvefix plus là 1kg/tấn thức ăn.

Đối với lợn con là 2kg/tấn thức ăn và sau đó là 1kg/tấn thức ăn ở giai đoạn vỗ béo đã mang lại kết quả tốt.

2.7.2. Một số các chất vô cơ có khả năng làm giảm độc tính aflatoxin

*** Các chất khoáng sét (clay minerals)**

Các chất khoáng sét là các chất khoáng thứ cấp được hình thành do quá trình phong hóa của các loại silicat và đặc trưng bởi cấu trúc tầng lớp.

Chất khoáng sét 3 lớp - montinorillonite có khả năng hấp phụ cao, có tính không đặc hiệu và phụ thuộc vào thể tích của màng hợp thủy. Các phân tử độc chất bị hút tới màng và bị cản lại. Liên kết này không phải là cố định hóa học, chỉ là một phức hợp sáng, dựa trên cầu nối H-O-H (lực hút Van-der-vaals) ở trong màng hợp thủy, nó có thể mở nếu môi trường thích hợp.

Các chất khoáng sét là những chất hấp phụ rẻ tiền và có nhiều ưu điểm. Tuy nhiên chúng hút cả các vitamin và chất dinh dưỡng.

*** Các chất khoáng zeolit**

Zeolit là các chất khoáng thứ cấp có cấu trúc tinh thể. Có cả zeolit thiên nhiên và tổng hợp. Trên bề mặt của zeolit có một vật tích điện đặc biệt. Zeolit hút các phân tử

nước cũng như các phân tử khác. Khả năng hút độc tố aflatoxin của các zeolit phụ thuộc vào nguồn gốc của chúng. Vì kích thước của các phân tử là một yếu tố quan trọng trong sự liên kết, loại zeolit hấp phụ aflatoxin cũng hấp phụ các phân tử dinh dưỡng có cùng kích thước.

*** Các chất trùng phân như polyvinylpyrrolidone**

Polyvinylpyrrolidone là một homopolymer của N-vinyl-2-pyrrolidon. Là chất bột trắng mịn, có trọng lượng phân tử cao, tan trong nước và các dung môi hữu cơ.

Các chất trùng phân này có cơ chế tác dụng tương tự như khoáng clay (minerals). Các thành phần polymer hút các phân tử nước, các liên kết cầu nối hydro hình thành một màng hợp thủy. Nhờ có màng này, cùng với các phân tử nước, các thành phần phân cực khác cũng bị hấp phụ.

Khả năng hấp phụ của các chất trùng phân tốt nhưng chúng có nhược điểm rất lớn là các phân tử phân cực có cùng kích thước như vitamin dễ bị hấp phụ. Những phân tử độc tố nấm không phân cực sẽ không bị hấp phụ.

*** Than hoạt tính**

Là chất bột màu đen, không mùi, không vị, không tan trong nước và nhiều dung môi khác. Than hoạt tính được đốt từ gỗ, xương động vật và các vật chất hữu cơ khác. Đặc tính quan trọng nhất của than hoạt tính là có khả năng hấp phụ rất cao. Khác với một số chất hấp phụ khác, than hoạt tính hấp phụ tất cả các phân tử mang điện tích dương và điện tích âm. Than hoạt tính có khả năng hấp phụ nhiều loại chất độc và aflatoxin. Cơ chế tác dụng của nó về bản chất là phủ một bề mặt tiểu phân và làm dễ quá trình đào thải chất độc qua phân.

2.7.3. Chế phẩm hóa sinh học

Các chế phẩm hạn chế độc hại của aflatoxin trong cơ thể tác động theo con đường sinh hóa học thường ít gây hại cho người và động vật. Một trong các chế phẩm được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi thú y hiện nay là Mycofix plus.

Chế phẩm hóa sinh học Mycofix plus do hãng Biomin (Austria) sản xuất được bổ sung vào thức ăn gia súc, gia cầm. Theo giới thiệu của hãng sản xuất thì Mycofix plus có tác dụng làm vô hoạt các độc tố nấm mốc, trong đó có aflatoxin. Cơ chế tác dụng của Mycofix plus một mặt thông qua sự hấp phụ mycotoxin, mặt khác phá hủy cấu trúc hóa học của mycotoxin dựa trên các men có trong chế phẩm.

Quá trình hấp phụ mycotoxin xảy ra trên màng hợp thủy do chất hấp phụ tạo ra. Các phân tử aflatoxin và một số mycotoxin phân cực khác bị hút tới màng, cố định trên bề mặt màng và trở nên hoàn toàn vô hoạt. Các khoảng xúc tác trên màng hợp thủy điều

chính diện thể riêng của đa số các nhóm mycotoxin tạo nên cách hấp phụ đặc biệt của Mycofix plus. Quá trình này bắt đầu từ khoang miệng khi con vật tiết nước bọt (hoặc ngay trong thức ăn trước khi được tiêu hóa), tiếp tục ở dạ dày và ruột. Các độc tố bị cố định bởi Mycofix plus không hấp thu được vào máu. Hợp chất Mycofix plus và mycotoxin được hấp phụ cùng thải ra ngoài theo phân.

Zearalenone

Detoxified form

Trichothecenes form

Detoxified

Hình 2.2 : Sự phân hủy các độc tố nấm mốc nhờ men Epoxydaza và Lactonaza

Các mycotoxin không phân cực hoàn toàn bị các men có trong Mycofix plus phá hủy. Men epoxydaza phá cấu trúc của nhóm chức năng 12, 13 - epoxy (phần độc nhất của Trichothecenes).

Robert Glavits (1992) đã thử tác dụng của Mycofix plus làm vô hoạt aflatoxin B₁, với các liều lượng 400 và 1000ppb aflatoxin, 2kg Mycofix plus/1 tấn thức ăn bổ sung trong thức ăn của gà công nghiệp. Kết quả cho thấy: Các lô gà cho ăn các thức ăn có bổ sung aflatoxin B₁, đều có hiện tượng giảm tăng trọng, tăng mức tiêu tốn thức ăn. Về biến đổi bệnh lý có các hiện tượng như: Gan nhợt màu, thoái hóa mỡ ở gan, tăng sinh ống mật và viêm túi mật. Tác dụng của Mycofix plus làm hạn chế hiện tượng này thể hiện ở các lô gà cho ăn thức ăn bổ sung đồng thời aflatoxin và Mycofix plus ở các liều lượng trên.

Kiểm tra trong phòng thí nghiệm và trên đại trà cho thấy: Mycofix plus có tác dụng làm giảm ảnh hưởng xấu của aflatoxin đối với gà thịt cũng như gà đẻ, làm cho gia cầm không có dấu hiệu bệnh lý ở gan, thận và túi mật, gà khỏe hơn và tăng sức đề kháng với bệnh. Với hàm lượng < 2kg/tấn thức ăn, Mycofix plus chỉ có tác dụng tốt ở liều aflatoxin B₁ thấp (200-400ppb). Nếu hàm lượng aflatoxin B₁ < 100ppb thì lượng

Mycofix plus chỉ cần < 1kg/tấn thức ăn. Mycofix plus có thể được đưa vào sử dụng trong chăn nuôi nhằm phòng chống độc tố nấm mốc.

Tác dụng của 1,2 - dithiole - 3 - thione (DTT), một chất cảm ứng của enzym đơn chức năng đến quá trình hình thành các liên kết aflatoxin - ADN trong gan chuột được Egner P.A. và cộng sự nghiên cứu năm 1990. Các liên kết ADN chính như aflatoxin B - N7 Guanin thải theo nước tiểu chuột được cho uống DTT giảm đi rất đáng kể. Từ đó rút ra kết luận DTT là chất có thể chống lại ung thư do aflatoxin gây ra.

Trong nhân y, chế phẩm Oltipraz được coi như một loại thuốc chống ung thư do aflatoxin gây ra.

Kết quả nghiên cứu của Firozi P.F. và cộng sự (1996) về tác dụng của chế phẩm Curcumin đến hệ thống men Cytochrom P450 tham gia xúc tác quá trình hoạt hóa aflatoxin B₁, cho thấy: Curcumin ức chế 50% sự hình thành các mối liên kết aflatoxin B₁ - ADN. Nó có thể hạn chế quá trình ung thư do các chất hóa học thông qua việc điều chỉnh chức năng của cytochrom P450.

Phạm Khắc Hiến, Lê Thị Ngọc Diệp (1999) đã nghiên cứu tác dụng của việc hạn chế độc hại do aflatoxin trên gà và cho biết: Cao Actiso 10%, liều lượng 6 ml/lít nước uống của gà có tác dụng làm giảm rõ rệt tình trạng trúng độc do aflatoxin B₁ hàm lượng 200 và 500ppb gây ra. Trong, thịt và gan gà nhiễm độc có tác động của Actiso đã không hoặc chỉ phát hiện thấy lượng aflatoxin B₁, tồn dư nhỏ hơn rất nhiều so với mức cho phép trong thực phẩm.

Chương III

ĐỘC TỔ HCN TRONG SẢN PHẨM SẴN

Sắn được trồng nhiều nơi thuộc Châu Á, Châu Phi và Nam Mỹ; diện tích trồng hàng năm khoảng 3,9 triệu ha, sản lượng khoảng 160 triệu tấn. Sản phẩm sắn (củ, lá) được sử dụng làm thức ăn cho gia súc, gia cầm khá phổ biến ở nhiều nước trên thế giới, kể cả một số nước không trồng sắn ở Châu Âu. Bột củ sắn được phối hợp vào thức ăn hỗn hợp với tỷ lệ khá cao, từ 20% đến 30% trong thức ăn cho bò, 30% đến 50% trong thức ăn cho lợn và từ 20% đến 30% trong thức ăn cho gia cầm. Trong sắn có axit cyanhydric, đó là một chất gây độc đối với gia súc, gia cầm và nó là yếu tố hạn chế cho việc sử dụng sắn trong chăn nuôi. Chính vì vậy, sắn được sự quan tâm nghiên cứu của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Các nghiên cứu tập trung vào cấu tạo hóa học của độc tố, cơ chế gây độc, phương pháp loại bỏ độc tố trong sản phẩm sắn và mức độ sử dụng sắn có hiệu quả trong thức ăn hỗn hợp của gia súc, gia cầm.

3.1. Giới thiệu về độc tố HCN trong cây sắn

3.1.1. Quá trình hình thành và cơ chế gây độc của axit cyanhydric

Quá trình hình thành:

Axit cyanhydric không tồn tại tự do trong cây sắn mà nó nằm trong Cyanogen Glucoside (Linamaroside và Lotostraloside); khi thủy phân Cyanogen glucoside sẽ được Linamaroside, chiếm khoảng trên dưới 90%, và Lotostraloside, chiếm khoảng trên dưới 10% (Gomez, 1991; Nartey, 1978).

Trong cây, chất Linamaroside được tổng hợp từ Valin, còn chất Lotostraloside được tổng hợp từ Isoleusin (Nartey, 1978).

Quá trình thủy phân Cyanogen Glucoside (Linamaroside và Lotostraloside) để tạo thành HCN trong cây sắn xảy ra theo hai bước (Fuller, 1987; Maner, 1987; Gome, 1983). Cụ thể là:

Phân giải Cyanogen Glucoside thành glucose và bộ phận aglicon dưới tác dụng của enzym glucosidaza hoặc Linamariaza.

R của linamarosid = CH₃

(bộ phận aglicon)

Hình 3.1. Quá trình phân giải Cyanogen glucosid

Phân giải Aglicon dưới tác dụng của enzym đặc hiệu hoặc nước thành axit cyanhydric và axeton (nếu phân giải Linamaroside thì cho axeton, còn Lotostraloside thì cho metiethixeton).

Hình 3.2: Quá trình phân giải Aglicon

Axit cyanhydric có cấu tạo tinh thể, hình kim, không màu, không hòa tan trong cồn, ête, tan ít trong axeton nhưng dễ bay hơi, dễ hòa tan trong nước (Đinh Văn Lữ, 1972; Silvestre và Arraudeau (tài liệu dịch 1990); Holleman và cs., 1989).

*** Cơ chế gây độc**

Cơ chế gây độc của axit cyanhydric đối với gia súc, gia cầm đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, nhưng kết luận về vấn đề này còn có nhiều ý kiến khác nhau. Tuy nhiên, cơ chế chính gây độc được nhiều ý kiến đồng thuận hơn cả.

Đối với trường hợp ngộ độc cấp tính thì do gốc Cyanua (CN^-) kết hợp với hemoglobin của hồng cầu để tạo thành phức chất Cyanohemoglobin. Chất này không có khả năng vận chuyển oxy trong máu làm cho mô bào và não bị thiếu oxy. Mặt khác, axit cyanhydric cũng có dạng kết hợp với ion Cu^{+2} được giải phóng do sự oxy hóa các tế bào crome, dạng kết hợp này lại đóng vai trò như một chất oxy hóa các enzym và làm ức chế vận chuyển các electron trong tế bào, gây ra sự thiếu hụt oxy trong toàn bộ các mô bào của cơ thể động vật. Những tác nhân trên đã gây suy nhược thần kinh ở các trung tâm tủy sống (medullar centers) từ đó dẫn đến tê liệt toàn bộ hệ thống thần kinh và làm cho động vật bị chết. Vì vậy, axit cyanhydric được xếp vào loại chất độc nguyên sinh chất (protoplasma poison) mạnh nhất đối với tất cả các dạng cơ thể sống (Oke, 1969; Nambisan, 1985; Maner và Pond, 1987).

Khi động vật ăn liên tục trong thời gian dài thức ăn có chứa axit cyanhydric với hàm lượng nhỏ; thì axit cyanhydric không gây tử vong nhưng gây ảnh hưởng xấu đến hấp thu và sử dụng các chất lấy từ thức ăn như methionin, cystin, vitamin B_{12} , sắt, đồng, iod... làm cho cơ thể thiếu hụt các chất này ngay cả khi khẩu phần ăn đầy đủ hoặc dư thừa các chất đó. Vì vậy, động vật sẽ sinh trưởng chậm, hiệu quả sử dụng thức ăn thấp, dễ mắc bệnh, lâu dài sẽ dẫn đến tử vong. Trường hợp này gọi là ngộ độc mãn tính (Oke, 1969; Maner và Pond, 1987).

3.1.2. Triệu chứng ngộ độc HCN và liều lượng HCN gây độc ở động vật

Triệu chứng ngộ độc cấp tính axit cyanhydric ở động vật là: Phản xạ không bình thường (điên khùng) hoặc là mất dần phản xạ, giảm tính thèm ăn, gầy yếu, sinh trưởng,

sinh sản giảm, dễ mắc bệnh. Nhìn chung, các triệu chứng ngộ độc ở thể mãn tính HCN rất khó phân biệt với triệu chứng gia súc bị ngộ độc các chất khác hoặc bị mắc bệnh nếu như không biết rõ về việc gia súc được cho ăn các sản phẩm sắn kéo dài (Oke, 1969; Mener và Pond, 1987).

Theo Silvestre và Arraudeau (tài liệu dịch, 1990) và Arraudeau, 1990; Gomez, 1991; Nartey, 1978 thì liều lượng HCN gây độc đối với động vật vào khoảng 2,5 mg/1kg thể trọng. Tuy nhiên, các loài động vật khác nhau, các giống khác nhau, các cá thể khác nhau và tuổi khác nhau sẽ có khả năng chống chịu với HCN khác nhau. Có những thí nghiệm trên gia súc cho thấy ở liều lượng 5 - 7 mg HCN, thậm chí trên 10 mg HCN/1kg thể trọng vẫn không thấy gia súc bị ngộ độc.

Đối với người lớn, liều lượng gây độc là 20mg HCN/1kg thể trọng, liều lượng gây chết là 50mg HCN/1kg thể trọng.

3.1.3. Axit cyanhydric trong cây sắn và sản phẩm sắn

Hàm lượng axit cyanhydric trong sắn phụ thuộc vào giống sắn, các bộ phận của cây sắn, tuổi các bộ phận của cây sắn và mùa vụ thu hoạch.

**** Giống sắn***

Một số giống sắn có hàm lượng HCN trong củ thấp. Ví dụ trong thịt của củ sắn chuối đỏ, hàm lượng HCN là 3,04mg%. Nhưng một số giống thì hàm lượng HCN lại rất cao. Ví dụ hàm lượng HCN trong thịt củ của sắn dừ là 8,27mg%. Hàm lượng HCN trong lá sắn cũng tùy thuộc theo giống, một số giống sắn như Ba Trắng, Nếp Hồng Hà, KM140-1 chỉ có từ 600-900mg HCN/1kg vật chất khô của lá, nhưng một số giống khác như KM 95; KM140-2, KM108-2 thì có tới 1500-1700mg HCN/1kg vật chất khô (VCK) của lá.

Căn cứ vào hàm lượng HCN trong củ sắn, người ta chia các giống sắn thành 2 nhóm: nhóm sắn ngọt và nhóm sắn đắng. Nhóm sắn ngọt bao gồm các giống sắn có hàm lượng HCN trong củ nhỏ hơn 80 ppm trong 100 gram chất tươi; theo sự phân loại khác thì sắn ngọt có hàm lượng HCN nhỏ hơn 0,01% trong chất tươi. Nhóm sắn đắng là các giống sắn có hàm lượng HCN ≥ 80 ppm trong 100 gram củ sắn tươi và theo sự phân loại khác là có hàm lượng HCN $\geq 0,01\%$ trong củ tươi (Sinha và Nair, 1968 trích từ Silvestre và cộng sự (tài liệu dịch, 1990) Nartey, 1978; Fuller, 1987; Goll, 1981).

Các bộ phận của cây sắn

Axit cyanhydric phân bố không đều trên cây sắn, nó tập trung chủ yếu ở bộ phận dưới mặt đất. Hàm lượng axit cyanhydric ở các bộ phận dưới mặt đất chiếm trên dưới 70% tổng lượng HCN của cây, trong đó, khoảng 9% ở trong gốc già và khoảng 60% ở trong rễ, củ so với tổng lượng HCN của cây.

Hàm lượng axit cyanhydric ở các bộ phận trên mặt đất chiếm khoảng trên dưới 29% tổng lượng axit cyanhydric của cây, trong đó lá chiếm khoảng trên dưới 2%, trong thân chiếm khoảng trên dưới 27% tổng lượng HCN của cây sắn.

Trong một bộ phận của cây sắn, hàm lượng HCN phân bố cũng không đồng đều. Ví dụ trong củ sắn, hàm lượng HCN trong vỏ gỗ là 7,6mg%, vỏ thịt 21,0mg%, hai đầu củ 16,2mg%, thịt sắn 9,72mg% và lõi sắn 15,8mg%. Trong lá sắn thì hàm lượng HCN ở cuống lá và gân lá ít hơn so với phiến lá. Trong thân cây sắn thì hàm lượng HCN ở lõi bắp ít hơn ở lớp gỗ và ở lớp gỗ ít hơn ở lớp vỏ cây.

Hàm lượng HCN còn biến động theo tuổi của từng bộ phận của cây. Ví dụ đối với lá sắn thì hàm lượng HCN trong 1kg chất tươi của búp sắn là từ 330 - 790 ppm, của lá bánh tẻ là từ 340 - 1040 ppm, của lá già là từ 210 - 730 ppm.

Hàm lượng HCN trong lá và trong thịt củ sắn có mối tương quan thuận với $R = 0,55$. Như vậy các giống sắn có hàm lượng HCN trong lá càng cao thì cũng có hàm lượng HCN trong củ càng cao và ngược lại (Fuller, 1987; Mener, 1987; Goll, 1981).

3.2. Phương pháp hạn chế và loại bỏ HCN trong sản phẩm sắn

3.2.1. Nguyên lý cơ bản về việc loại bỏ độc tố trong sản phẩm sắn

Các phương pháp chế biến để loại bỏ độc tố trong sắn dựa trên ba nguyên lý cơ bản dưới đây:

Loại bỏ trực tiếp Cyanogen glucosid bằng cách hòa tan trong nước. Vì Cyanogen glucosid sản sinh ra HCN, chất này bị loại bỏ thì HCN cũng bị loại bỏ.

Làm phân giải Cyanogen glucosid thành xeton và HCN, sau đó dùng nhiệt làm bốc hơi HCN hoặc dùng nước làm rửa trôi HCN.

Làm phá hủy hoặc ức chế enzym Linamariaza và glucosidaza. Các men này không hoạt động thì Cyanogen glucosid không thể phân giải thành xeton và HCN.

Dựa vào các nguyên lý trên, trong thực tế người ta đã sử dụng các biện pháp dưới đây để hạn chế và loại bỏ HCN trong sản phẩm sắn.

3.2.2. Một số phương pháp chế biến củ sắn

Các phương pháp chế biến sắn củ tạm thời được chia thành 3 loại: Sử dụng nhiệt, sử dụng nước và lên men. Sự phân loại này chỉ là tương đối vì có những phương pháp vừa sử dụng nhiệt vừa sử dụng nước hoặc ngược lại.

3.2.2.1. Các phương pháp chế biến sắn dựa vào sử dụng nhiệt làm khô trực tiếp

*** Chế biến và bảo quản sắn lát phơi khô hoặc sấy khô**

Sắn sau khi thu hoạch được rửa sạch, bóc vỏ hoặc không. Thái lát thủ công bằng tay hoặc bằng máy. Sau đó sắn được phơi trên sàn, nong, nia, cót... hoặc tốt nhất là trên sân xi măng. Sau khi phơi khô sắn phải để nguội rồi mới đem cất trữ.

*** Chế biến sắn khô - nghiền bột**

Người ta để cả củ hay thái lát rồi phơi khô hoặc sấy khô trong các lò sấy thủ công hay lò sấy điện. Sau khi sắn khô thì nghiền thành bột và cất trữ.

* Chế biến sản viên

Đây là phương pháp của Thái Lan. Sản được rửa sạch rồi nghiền nhỏ sau đó được ép đùn qua hệ thống trục ngang. Trong quá trình ép sản bị mất nước và được ép thành các viên dài từ 1-2cm sau đó sấy khô và bảo quản khi độ ẩm nguyên liệu là 13%.

3.2.2.2. Các phương pháp chế biến sử dụng nước

* Phương pháp ngâm củ sản tươi để chế biến bột sản

Ở những nơi sản nguồn nước, có thể chế biến bột sản bằng cách ngâm củ sản tươi dưới nước 10 - 15 ngày đến khi củ sản mềm. Sau đó, vớt củ đem phơi hoặc sấy khô và bảo quản nơi khô ráo. Khi sử dụng thì bóc vỏ, lấy bột bên trong.

* Chế biến tinh bột từ sản khô

Củ sản khô được cắt thành miếng và được nghiền sơ bởi lực ép liên tiếp sao cho các miếng sản không bị nghiền quá kỹ, ngâm sản trong nước, tách tinh bột trong sản, sau đó phơi hoặc sấy khô tinh bột và cất trữ.

* Sản xuất tinh bột sản ướt

Củ sản phải được thu hoạch và chế biến ngay trong 24 giờ sau thu hoạch để sản xuất được tinh bột sản có chất lượng cao nhất. Sản được bóc vỏ, mài xát sản thành bột nhão, lọc bột để tách bã sản khỏi bột sản, lắng đọng nước lọc để thu hồi tinh bột, phơi hoặc sấy tinh bột (có độ ẩm dưới 13%), bảo quản tinh bột trong chum, vại có nắp đậy kín hoặc túi nilon.

* Chế biến hạt sản

Từ sản khô được loại đi cát bụi... và được nghiền thành bột, sau đó phun nước để sản phẩm có độ ẩm khoảng 18%. Hạt sản được chế biến bằng cách ép trong các rô sắt có lỗ và làm tăng nhiệt độ lên 82⁰C, do đó sản được hồ hóa và tạo ra các hạt có khả năng kết dính tốt. Sau đó hạt được thổi gió qua để giảm độ ẩm đi 3-4%, sau đó bao gói sản phẩm.

3.2.2.3. Các phương pháp chế biến dựa vào lên men sản phẩm

* Ủ chua củ sản

Sản củ sau khi thu hoạch rửa sạch sau đó nghiền nhỏ và trộn thêm các loại thức ăn khác. Mỗi 100kg củ sản ủ chua với 10kg cám gạo và 0,5kg muối ăn, hoặc 70kg củ sản ủ với 30kg dây lá khoai lang và 0,5kg muối, trộn đều sau đó cho vào dụng cụ ủ (túi polietylen hoặc chum vại...). Khối ủ được nén chặt, đậy kín để tạo điều kiện yếm khí cho sự lên men.

* Làm giàu protein cho nguyên liệu sản

Sản khô được cắt nhỏ có đường kính từ 2-4mm, làm ẩm đến 45% và hấp. Sau khi hấp để nguội nguyên liệu xuống 40⁰C, sản được trộn với dung dịch giống (*Rhizopus oryzae* MUCL 28627) và 3,4g ure; 1,5g KH₂PO₄; 0,8g MgSO₄.7H₂O và 22,7g acid

citric tính trên 100g chất khô. Tạo cho môi trường có độ ẩm 60%, pH là 3,5 và được trải đều trên các khay có đục lỗ, đặt trong phòng kín và lên men trong 65 giờ.

*** Chế biến bột Musseque**

Đây là phương pháp của Angola. Sắn tươi sau khi rửa sạch, thái lát và để thành đồng cho lên men trong 3 tuần. Sau đó sản phẩm được nghiền và rây bằng rổ. Lượng bột ẩm sau khi thu được có thể đem phơi nắng để cất hoặc nướng, rang....

*** Chế biến bột Gari**

Củ sắn sau khi rửa và bóc vỏ sẽ được xát thành bột và cho vào các thùng để lên men trong vòng từ 1- 3 ngày. Sau đó có thể sử dụng làm thức ăn cho người và gia súc.

3.2.3. Một số phương pháp chế biến lá sắn

*** Chế biến bột lá sắn**

Theo Dương Thanh Liêm (1998) thì bột lá sắn được chế biến như sau: Lá sắn sau khi được thu gom thì loại bỏ hết cuống lá, phơi héo tại ruộng trong một ngày cho giảm bớt nước. Sau đó tiếp tục phơi nắng trên sân hoặc đưa vào hệ thống sấy ở nhiệt độ 60-100⁰C cho khô giòn. Lá sau khi khô giòn được đưa đi nghiền thành bột, trải mỏng bột lá cho bay hơi nước và HCN. Cho bột lá sắn vào bao nhưng để hở miệng túi sau 2 tuần mới đóng gói để trong thời gian này, HCN tiếp tục thoát ra ngoài.

*** Phơi khô thân, lá sắn non**

Sắn trồng dày với mục đích để thu lá, sau trồng 3- 3,5 tháng thu cắt lứa đầu, sau đó cứ khoảng 1,5 - 2 tháng thu cắt một lần. Thân cây sắn còn non, phơi cả thân, lá sắn (để nguyên cả cây hoặc băm nhỏ trước khi phơi) khi khô thì đánh đồng hoặc nghiền thành bột để dự trữ.

*** Chế biến cao lá sắn**

Lá sắn được nghiền nhỏ sau đó lọc bỏ bã và đun nước dịch lá sắn ở nhiệt độ 80⁰C, khi thấy có váng nổi lên thì vớt lấy và loại bỏ nước, có thể cho 10 - 20 g axit citric/100 lít nước dịch lá sắn khi bắt đầu thấy váng nổi lên thì sẽ thu được sản phẩm triet đề hơn. Sản phẩm thu được có thể sử dụng trực tiếp cho gia súc gia cầm hoặc sấy khô nghiền bột để trộn vào thức ăn hỗn hợp.

*** Ủ chua ngọn lá sắn**

Theo Nguyễn Xuân Trạch (2005) thì quy trình ủ chua ngọn và thân lá sắn như sau: Ngọn lá sắn thu về cần phải đập dập phần thân cây và băm nhỏ 3 - 4cm. Cứ 100kg ngọn lá sắn cần bổ sung 5 - 6kg bột sắn hay cám gạo, cám ngô và 0,5kg muối ăn.

3.2.4. Khả năng loại bỏ HCN từ các phương pháp chế biến

*** Hiệu quả của phương pháp sử dụng nước**

Củ sắn tươi giống chuối đỏ có hàm lượng HCN là 3,30mg% chất tươi, nếu không ngâm nước, chỉ thái lát phơi khô thì hàm lượng HCN còn 0,92mg%, nếu thái lát ngâm nước 1 ngày và phơi khô thì hàm lượng HCN chỉ còn 0,85mg%, nếu thái lát ngâm

nước vôi 5% trong 12 giờ và phơi khô thì còn 0,44mg%. Nếu lọc thô (mài sẵn nhỏ sau đó lấy tinh bột) thì hàm lượng HCN còn 0,73mg% chất tươi; nếu ngâm lọc (ngâm nước dài ngày, lọc lấy tinh bột) thì hàm lượng HCN chỉ còn 0,36mg% chất tươi.

Lá sẵn tươi giống KM94 có hàm lượng HCN là 1073 mg/kg VCK, nếu thái nhỏ, không ngâm nước, phơi khô thì hàm lượng HCN là 368 mg/kg VCK, còn nếu thái nhỏ, ngâm nước, phơi khô thì hàm lượng HCN chỉ còn 250 mg/kg VCK(Trần Thị Hoan và cs., 2011).

Như vậy dùng nước là một phương pháp khá hữu hiệu trong việc loại bỏ Cyanogen glucosid cũng như HCN trong sản phẩm sẵn.

* Hiệu quả của phương pháp sử dụng nhiệt

Củ sẵn tươi giống sẵn dù có hàm lượng HCN 11,06mg% chất tươi, thái lát (3 - 6 mm) phơi khô thì hàm lượng HCN còn 3,04mg% chất tươi, nếu thái lát (3 - 6 mm), sấy thủ công ở 70°C thì hàm lượng HCN còn 1,72 mg%.

Sử dụng nhiệt (phơi, sấy) là một trong những biện pháp hữu hiệu loại bỏ HCN trong sản phẩm sẵn.

* Hiệu quả của phương pháp ủ chua

Củ sẵn tươi giống chuối đỏ có hàm lượng HCN là 3,30mg% chất tươi, sau khi ủ xilo 4 tuần thì hàm lượng HCN còn 1,79mg% chất tươi, sau 8 tuần còn 1,62mg% chất tươi. Tương tự, củ sẵn tươi giống sẵn dù có hàm lượng HCN là 11,06mg% chất tươi, sau khi ủ 4 tuần, hàm lượng HCN còn 6,57mg% chất tươi, sau 8 tuần còn 6,13mg% chất tươi. Củ sẵn tươi có hàm lượng HCN là 112mg/1kg chất tươi, sau khi ủ chua 120 ngày thì hàm lượng HCN chỉ còn 44mg/1kg chất tươi. Một số tài liệu khác cho biết: củ sẵn tươi có hàm lượng HCN là 131,1mg/1kg chất tươi, sau 28 ngày ủ chỉ còn 25,6mg/kg chất tươi, sau 100 ngày ủ chỉ còn 8,7mg/kg chất tươi (Phạm Sỹ Tiếp, 1999; Nguyễn Thị Hoa Lý, 1999; Nguyễn Thị Lộc, 2001).

Hàm lượng HCN trong sẵn giống chuối đỏ là 8,76mg % chất tươi, trong sẵn dù là 21,61mg % chất tươi, sau khi ủ chua thì hàm lượng HCN tương ứng là 1,50mg% chất tươi (sẵn chuối đỏ) và 3,66mg% chất tươi (sẵn dù). Một số tài liệu khác cho biết: Hàm lượng HCN trong lá sẵn tươi từ 323 - 340mg/kg chất tươi, sau khi ủ 28 ngày, chỉ còn 68,2 - 88,4mg HCN/kg chất tươi. Hàm lượng HCN trong sẵn tươi là 862,5mg/kg VCK sau khi ủ đã giảm xuống chỉ còn 32,5mg/kg VCK (Bùi Văn Chính, 1995; Nguyễn Thị Hoa Lý, 1999; Phạm Sỹ Tiếp 1999).

Phương pháp ủ chua có thể loại bỏ 70% - 90% độc tố HCN trong củ và lá sẵn. Đây là phương pháp dễ thực hiện, không phụ thuộc vào thời tiết, mặt khác thức ăn ủ chua còn làm tăng tính ngon miệng của vật nuôi.

3.3. Nghiên cứu, sử dụng sẵn trong chăn nuôi

Ngoài độc tố HCN, sản phẩm sẵn (củ, lá) còn có các yếu tố hạn chế khác như: Củ sẵn nghèo protein và một số axit amin thiết yếu có tỷ lệ thấp; lá sẵn giàu protein nhưng

tỷ lệ xơ lại khá cao. Chính vì vậy, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu sử dụng sắn trong chăn nuôi với mục đích tìm ra mức sử dụng củ, lá sắn thích hợp, bảo đảm vật nuôi sinh trưởng, chuyển hóa thức ăn tốt, chi phí thức ăn cho một đơn vị sản phẩm thấp. Tuy các kết quả nghiên cứu không chỉ rõ ảnh hưởng của chất độc hay các yếu tố hạn chế khác của sắn đến sinh trưởng và sinh sản của gia súc, gia cầm nhưng các kết quả này rất có ý nghĩa thực tiễn, vì các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra mức độ phối hợp củ và lá sắn hợp lý vào khẩu phần ăn của vật nuôi.

3.3.1. Nghiên cứu sử dụng sắn trong chăn nuôi gia súc nhai lại

Ở Ấn Độ đã sử dụng các khẩu phần cho bò thịt với 80% thân, lá sắn tươi; ở Madagasca đã sử dụng từ 20 - 30% củ sắn tươi trong khẩu phần thức ăn cho bò sữa; ở Châu Âu thức ăn hỗn hợp thường sản xuất với 20% bột sắn cho bò đực và 40% bột sắn cho bò sữa.

Về sử dụng lá sắn trong chăn nuôi gia súc nhai lại đã có một số nghiên cứu như sau: Thí nghiệm hai khẩu phần cho bò sữa, khẩu phần 1 có chứa bột hạt bông, khẩu phần 2 có chứa bột lá sắn với mức 9% trong vật chất khô trong khẩu phần; kết quả cho thấy năng suất sữa của 2 lô là tương đương nhau. Nghiên cứu thay thế thức ăn hỗn hợp của dê sinh trưởng bằng bột lá sắn với các mức 25, 50, 75, và 100%; kết quả cho thấy từ mức 75% trở xuống có kết quả tăng trọng tương đương và chi phí thức ăn cho 1kg tăng trọng thấp hơn so với đối chứng (0% bột lá sắn) (Dương Tiến Khang, 2000; Warpat, 1993; Vũ Văn Tý, 2003; Ngô Tiến Dũng 2004).

3.3.2. Nghiên cứu sử dụng sắn trong chăn nuôi lợn

3.3.2.1. Nghiên cứu trên lợn thịt

Nhiều tác giả đã khuyến cáo sử dụng bột sắn với tỉ lệ 30 - 50% trong khẩu phần sẽ đạt được hiệu quả kinh tế cao nhất. Nhưng cũng có thông báo cho biết bột sắn có thể dùng với tỷ lệ 60% trong khẩu phần vẫn cho tăng khối lượng 800g/ngày. Theo Serres và Tilon (1973) (trích theo Phạm Sỹ Tiệp, 1999) thì để tăng khối lượng 800g/ngày có thể dùng với khẩu phần có 75% bột sắn. Nhưng tăng khối lượng ảnh hưởng rất nhiều bởi chất lượng protein bổ sung. Tăng khối lượng đạt tối đa khi bổ sung protein có nguồn gốc động vật. Với khẩu phần có bột sắn, đậu tương và được bổ sung DL - methionine cũng cho kết quả tương tự.

Nghiên cứu thay thế 28,5 %; 39,8%; 60% và 80% bột ngô bằng bột sắn để vỗ béo lợn thịt. Kết quả cho thấy sử dụng mức 39,8% cho tăng khối lượng cao nhất là 740g/con/ngày còn ở các mức khác thấp hơn. Nghiên cứu sử dụng khẩu phần cơ sở (lô I) gồm 50% bột sắn, 50% cám, 100 g protein thô từ cá, 1kg rau khoai lang và sử dụng khẩu phần thí nghiệm thay thế bột sắn bằng sắn ủ 60 ngày (lô II). Kết quả cho thấy tăng khối lượng lợn (g/con/ngày) lần lượt là 563 và 552 và tiêu tốn thức ăn lần lượt là 3,42 và 3,54kg/kg tăng khối lượng. Tuy lô II tiêu tốn thức ăn lớn hơn và tăng khối lượng thấp hơn đôi chút nhưng không có sự sai khác ($P > 0,05$). Sắn ủ nuôi lợn có hiệu quả kinh tế cao hơn bột sắn vì phương pháp chế biến này đơn giản và không phụ thuộc vào

điều kiện thời tiết (Tư Quang Hiền, Phạm Sỹ Tiếp, 2005. Nguyễn Khắc Khôi, 1982. Liu Jian Ping, 2000. Nguyễn Thị Hoa Lý và cs., 1999).

Nghiên cứu sử dụng lá sắn ủ chua (1,6kg/con/ngày) cho lợn thịt trong 120 ngày, kết quả đã làm khả năng sinh trưởng của lợn tăng và làm cho tỷ lệ tiêu tốn thức ăn /1kg tăng khối lượng giảm 20% so với đối chứng. Nghiên cứu các mức lá sắn ủ chua trong khẩu phần ăn của lợn thịt cho thấy: Mức thay thế 10% VCK trong khẩu phần (0,25- 0,5kg lá sắn ủ/ngày) là phù hợp để tận dụng lá sắn làm thức ăn chăn nuôi (Bùi Văn Chính, 1969 - 1995. Dương Thanh Liêm và cs., 1998. Nguyen Van Lai and Rodriguez, 1988, Nguyễn Thị Hoa Lý, 2000).

3.3.2.2. Nghiên cứu trên lợn nái

Một số thí nghiệm phối hợp bột củ sắn vào thức ăn hỗn hợp của lợn nái chữa và nuôi con với các mức 0%, 20%, 30% và 65% có sự cân đối về protein và năng lượng. Kết quả cho thấy: Mức quá cao (65%) đã ảnh hưởng xấu đến các chỉ tiêu sinh sản và khối lượng lợn con ở 21 ngày tuổi. Vì vậy, các nhà nghiên cứu khuyến cáo: Mức phối hợp 30% bột sắn trong khẩu phần là hợp lý (Ravindran và cộng sự, 1983; Gomez và cộng sự, 1984).

Các thí nghiệm khác phối hợp bột củ sắn trong khẩu phần ăn cho lợn nái chữa và nuôi con với mức 25% đến 30%, có sự cân đối năng lượng và protein. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu về lợn mẹ (tăng trọng, hao hụt sau đẻ) và các chỉ tiêu về lợn con (số con đẻ ra, nuôi sống đến cai sữa, khối lượng lúc cai sữa) tương đương với lô đối chứng được ăn khẩu phần không có bột sắn. Các tác giả cùng khuyến cáo tỷ lệ bột củ sắn trong khẩu phần 30% là thích hợp (Nguyễn Nghi và cộng sự, 1984; Nguyễn Khắc Khôi và cộng sự, 1982).

Một số thí nghiệm đã phối hợp bột lá sắn vào thức ăn hỗn hợp của lợn nái chữa, nuôi con với mức 0% đến 10%. Kết quả là: Lô được ăn thức ăn có chứa 10% bột lá sắn có các chỉ tiêu cao hơn lô đối chứng. Nghiên cứu sử dụng lá sắn ủ chua ở mức 0, 10 và 20% VCK trong khẩu phần ăn của lợn nái, kết quả cho thấy số lợn con sơ sinh/lứa; khối lượng sơ sinh; khối lượng 21 ngày tuổi ở lô sử dụng 20% đều thấp hơn các lô còn lại. Các nhà nghiên cứu cho biết thức ăn hỗn hợp có bột lá sắn đã làm giảm tỷ lệ thai chết lưu trong bụng mẹ (Dương Thanh Liêm và cộng sự, 1998).

Nghiên cứu sử dụng sản phẩm sắn nuôi lợn con

Thí nghiệm đối với lợn con từ 14 đến 56 ngày tuổi cho ăn thức ăn hỗn hợp chứa 0%, 14%, 20%, 28% và 40% bột củ sắn, có sự cân đối năng lượng và protein. Kết quả cho thấy lợn con khỏe mạnh, khối lượng lúc cai sữa giữa các lô xấp xỉ nhau và không có sự sai khác rõ rệt. Một thí nghiệm khác đối với 5 lô lợn con từ 35 đến 63 ngày tuổi, các lô được cho ăn thức ăn cơ sở khác nhau: 1) ngô, 2) đại mạch, 3) lúa mỳ, 4) yến mạch, 5) bột củ sắn (35% khẩu phần), có sự cân đối về protein. Kết quả về tăng trọng (g/con/ngày) của các lô lần lượt là: 386g, 380g, 354g, 360g và 416g. Tăng trọng của lợn con lô ăn thức ăn có bột sắn cao hơn các lô khác được giải thích là năng lượng tiêu hóa của bột củ sắn cao hơn các thức ăn còn lại (Aumaitre, 1969, Serres, 1973, trích từ Maner 1987).

Các nghiên cứu sử dụng sắn nuôi lợn đã chỉ ra rằng mức độ phối hợp bột củ sắn vào thức ăn hỗn hợp của lợn thịt vào khoảng 30% đến 60% và lợn nái vào khoảng 20% đến

30% sẽ không có ảnh hưởng xấu đến khả năng sản xuất của lợn, mà còn cải thiện hơn khả năng sinh trưởng và sinh sản của lợn, không có hiện tượng lợn bị ngộ độc HCN, mặc dù khẩu phần có chứa bột sắn được sử dụng trong thời gian dài.

3.3.3. Nghiên cứu sử dụng sắn trong chăn nuôi gia cầm

Julián Buitrago, 2002 nhận định như sau: khi sử dụng củ hoặc lá sắn để chăn nuôi gia cầm chịu ảnh hưởng bởi rất nhiều các yếu tố bên trong và bên ngoài. Trong đó các nhân tố bên ngoài là: tuổi, quá trình chế biến (nghiền, đóng viên,...) và khẩu phần để nuôi gia cầm. Nhân tố bên trong là sự ảnh hưởng tới chất lượng, ích lợi và giá của sản phẩm. Vì vậy, đối với bột củ sắn, lượng tối đa sử dụng trong khẩu phần gia cầm chỉ từ 25- 30%. Nếu sử dụng với lượng lớn hơn thì phải sử dụng chất kết dính để giảm tính bụi của thức ăn.

Đối với bột lá sắn thì yếu tố gây hạn chế sử dụng là xơ của lá sắn. Vì vậy, không nên sử dụng vượt quá 6-8% trong khẩu phần. Khi sử dụng với số lượng thấp trong khẩu phần thì lá sắn vẫn là thành phần quan trọng cấu thành protein và sắc tố trong thịt và lông, da và trứng của gà thịt lẫn gà trứng.

3.3.3.1. Sử dụng bột củ sắn

* Nghiên cứu bổ sung bột củ sắn trong thức ăn hỗn hợp của gà thịt

Điểm hạn chế của bột củ sắn là thiếu hụt protein và một số axit amin thiết yếu, vì vậy phải phối hợp với các loại thức ăn khác để cung cấp đầy đủ các loại chất dinh dưỡng mà sắn thiếu. Trong khẩu phần sử dụng cho gia cầm thì đồ tương là thức ăn có đầy đủ axit amin và lipid. Phối hợp 82% bột củ sắn và 18% đậu tương có giá trị tương đương với ngũ cốc (Julián Buitrago, 2002).

Tại Mexico, người ta có thể sử dụng đến 50% bột sắn trong khẩu phần của gà con và cho kết quả sinh trưởng tương tự đối chứng, nhưng hiệu quả sử dụng thức ăn thấp hơn so với sử dụng bột ngô. Sử dụng bột củ sắn trong khẩu phần ăn của gà, nếu thức ăn được đóng viên thì bụi do sắn gây ra được khắc phục vì vậy có thể sử dụng bột củ sắn với lượng cao để thay thế cho ngũ cốc trong khẩu phần khởi động cũng như khẩu phần kết thúc của gà thịt. Lượng bột sắn có thể phối hợp từ 45-50% và bột lá sắn có thể từ 5-6%.

Thí nghiệm so sánh ảnh hưởng của ngô, sorghum và sắn đến khả năng tăng khối lượng của gà broiler từ 4-7 tuần tuổi. Kết quả cho thấy ở lô sử dụng bột sắn cho tăng khối lượng thấp hơn và tiêu tốn thức ăn cao hơn so với lô sử dụng ngô và bột sorghum nhưng sự sai khác này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Thí nghiệm trên gà broiler với 2 khẩu phần có bột củ sắn và ngô thì gà ăn khẩu phần ăn có bột sắn luôn có tỷ lệ nuôi sống cao hơn so với gà sử dụng ngô, tỷ lệ chết giảm 50% so với lô sử dụng ngô. Khi sử dụng bột sắn và không sử dụng chất chống khuẩn nhưng tỷ lệ sống vẫn cao hơn so với lô sử dụng ngô và có sử dụng chất chống khuẩn. Sự sai khác về tỷ lệ nuôi sống là có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu sử dụng 10% bột củ và lá sắn (50% bột củ và 50% bột lá sắn) vào khẩu phần của gà thịt broiler giai đoạn sinh trưởng. Kết quả cho thấy tỷ lệ này không ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng, hiệu quả sử dụng thức ăn và tỷ lệ thân thịt

của gà. Các nghiên cứu khác cho thấy: Khả năng tăng khối lượng của gia cầm không bị ảnh hưởng khi sử dụng khẩu phần có 50% bột củ sắn. Tuy nhiên, phân thải ra rất nhớt, vì vậy chỉ nên sử dụng tối đa là 30%. Bột sắn củ hiếm khi được sử dụng dưới tỷ lệ 10% trong thành phần thức ăn hỗn hợp, thường thì người ta hay sử dụng ở tỷ lệ từ 10- 40%. Ở một số nước nhiệt đới người ta còn thử nghiệm sử dụng đến 60% trong khẩu phần (Muller và cs., 1971. Tejada và Brambila, 1969. Gil và cs., 2000. Sriwattanaworachai và cs., 1989 dẫn theo Julián và cs., 2002. Tathawan và cs., 2002. Eruvbetine và cs., 2003. Stevenson và Jackson, 1983. Julián Buitrago, 2002).

Một số nhà nghiên cứu khác lại có nhận định như sau: Bột củ sắn đã được sử dụng thay thế cho ngũ cốc trong khẩu phần của gia cầm nhưng thường thấy làm giảm năng suất của gia cầm. Theo các tác giả thì nguyên nhân chủ yếu do lượng HCN có nhiều trong khẩu phần và thành phần khẩu phần thường thiếu protein, amino axit, mỡ khoáng và vitamin vì vậy phải bổ sung các thành phần hóa học thiếu và làm hạn chế HCN trong củ sắn. Bột sắn có thể sử dụng thay thế ngô, gạo vỡ hay bột sorghum như là nguồn thức ăn để bổ sung năng lượng trong khẩu phần cho gà broiler. Tuy nhiên, gà sử dụng bột sắn có khối lượng nhỏ hơn và tiêu tốn thức ăn lớn hơn các khẩu phần khác nhưng không có sự sai khác về mặt thống kê (Tiémoko, 1988. Saentaweesuk và cs., 2000a. Buitrago và Luckett, 1999. Liu Jian Ping, 2000. Stevenson và Jackson, 1983. Barry, 1974. Tobayayong, 1935; McMillan và Dudley. 1941. Khajarn và cs., 1986).

** Nghiên cứu sử dụng bột củ sắn chăn nuôi gà đẻ trứng*

Khi thay thế từ 10% đến 100% ngô bằng bột sắn cho gà đẻ trứng kết quả là ở mức thay thế cao rất khó cân bằng được tỷ lệ protein trong khẩu phần, màu sắc của lòng đỏ có xu hướng giảm dần khi tăng tỷ lệ bột sắn vì vậy phải bổ sung những nguồn giàu caroten vào trong khẩu phần. Tuy nhiên năng suất trứng vẫn tương đương với lô sử dụng 100% ngô (Pillai và cs., 1968. Gutiérrez và Martínez, 1997. Saentaweesuk và cs., 2000b. Hamid và Jalaludin, 1972).

Nhiều nghiên cứu cho thấy sử dụng từ 20 - 30% bột sắn cho gà thịt và gà đẻ trứng là phù hợp (Miranda. 1957; Enriquez. 1969; Agudu. 1972; Jalaladin. 1973; trích Silvestre và cộng sự, tài liệu dịch, 1990).

3.3.3.2. Sử dụng bột lá sắn

** Nghiên cứu sử dụng bột lá sắn chăn nuôi gà thịt*

Hamid và Jalaludin (1972) có nhận định như sau: Củ sắn thường được dùng trong khẩu phần, nhưng gần đây lá sắn đã trở thành sản phẩm khá triển vọng được sử dụng để cân bằng dinh dưỡng trong khẩu phần gia cầm, chúng có khả năng cung cấp xơ, khoáng và vitamin, đồng thời có giá rẻ và không cạnh tranh với củ.

Sử dụng bột lá sắn với tỷ lệ 4% để nuôi gà thịt Plymouth thì khối lượng gà kết thúc lúc 10 tuần tuổi cao hơn so với lô đối chứng từ 100 đến 400g và sử dụng bột lá sắn với các tỷ lệ 0; 2; 4; 6% để nuôi gà thịt công nghiệp 1A, đã có tác dụng tốt đến khả năng sinh trưởng của gà thịt. Tỷ lệ bổ sung thích hợp và có hiệu quả là 2- 4%. Nghiên cứu

đánh giá năng suất, khả năng sử dụng thức ăn và biến đổi của một số tổ chức của cơ thể gà ở thịt Anak 5 ở tuần tuổi khi sử dụng khẩu phần có bột lá sắn ở các tỷ lệ 0, 5, 10 và 15% cho kết quả như sau: Lượng thức ăn thu nhận, tăng khối lượng, chuyển hóa thức ăn của lô đối chứng và 5% lá sắn là khác nhau có ý nghĩa với lô sử dụng 10 và 15%. Khối lượng tim, gan, lách ở mức 0 và 5% cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với mức 10 và 15%. Vì vậy chỉ nên dùng tối đa là 5% cho gà broiler ở giai đoạn kết thúc (Duong Thanh Liem, 1985. Duong Thanh Liem, 1998. Iheukwumere và cs., 2008).

Thay thế bột đậu tương bằng bột lá sắn với các tỷ lệ 0, 30, 60% cho gà broiler thì khối lượng của gà lúc kết thúc thí nghiệm, khối lượng tăng trung bình, tiêu tốn thức ăn sai khác có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng (chỉ dùng bột đỗ tương). Gà sử dụng thức ăn thay thế 30% bột đỗ tương bằng bột lá sắn cho khối lượng kết thúc thí nghiệm, tăng khối lượng trung bình cao hơn còn tiêu tốn thức ăn thấp hơn so với sử dụng ở mức 60% và cũng cao hơn so với gà được nuôi bằng thức ăn có sử dụng bột lá keo đậu với các tỷ lệ trên (Onibi và cs., 2008).

Nghiên cứu ảnh hưởng của các mức bột lá sắn 0, 5, 10 và 15% trong khẩu phần gà thịt cho biết tổng lượng huyết thanh, albumin và hemoglobin ở mức 0 và 5% lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với mức sử dụng ở mức 10 và 15% bột lá sắn. Tuy nhiên tỷ lệ cholesterol, creatinine và ure thì không có sự sai khác nhau. Tỷ lệ thịt xẻ ở lô đối chứng lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô thí nghiệm và tác giả khuyến cáo chỉ sử dụng tối đa 5% bột lá sắn cho gà thịt broiler (Iheukwumere, 2007).

*** Nghiên cứu sử dụng bột lá sắn chăn nuôi gà sinh sản**

Julián Buitrago (2002) có nhận định là đối với bột lá sắn thì yếu tố gây hạn chế sử dụng là xơ của lá sắn. Vì vậy, không nên sử dụng vượt quá 6 - 8 % trong khẩu phần của gà đẻ. Khi sử dụng với số lượng thấp trong khẩu phần thì lá sắn vẫn là thành phần quan trọng cấu thành protein và sắc tố trong trứng gà.

Theo các tác giả như: Miranda (1957); Enquiez (1969); Agudu (1972) và Jalaladin (1973) (trích p. Silvestre) thì khi sử dụng bột lá sắn từ 2 - 6% cho gà sinh sản là có hiệu quả nhất. Dùng lá sắn trong khẩu phần ăn cho gà đẻ làm tăng sắc tố trong lòng đỏ trứng.

Ở Ấn Độ, bột lá sắn thay thế 50% bột củ sắn trong khẩu phần của gà đẻ, kết quả cho thấy dùng bột lá sắn tăng tỷ lệ đẻ lên 12% so với bột củ sắn (Pillai và cs., 1968).

Dương Thanh Liêm (1998) sử dụng bột lá sắn với các tỷ lệ 0; 2; 4; 6% bổ sung vào thức ăn cho gà sinh sản thì có tác dụng tốt, tỷ lệ carotene và vitamin A trong lòng đỏ trứng tăng theo tỷ lệ bổ sung bột lá sắn vào thức ăn, mức thích hợp là 3% sẽ đem lại hiệu quả cao nhất.

Như vậy, có thể đưa vào khẩu phần ăn của gà lượng bột lá sắn từ 2 - 6% tùy theo giai đoạn và đối tượng gà thịt hay gà trứng. Khi bổ sung bột lá sắn vào thức ăn cần phải lưu ý cân đối lại năng lượng của khẩu phần và không đưa với tỷ lệ bột lá sắn quá cao để tránh ảnh hưởng của độc tố HCN và ảnh hưởng của chất xơ đến sinh trưởng và chuyển hóa thức ăn của gà.

Chương IV

ĐỘC TỔ MIMOSIN TRONG KEO GIẬU

Cây keo giậu được trồng rất phổ biến ở Nam Mỹ, Châu Úc và Nam Á với mục đích làm thức ăn chăn nuôi. Keo giậu được trồng xen với cỏ hòa thảo trên đồng cỏ chăn thả đã mang lại nhiều lợi ích to lớn như: Cải tạo đất, nâng cao năng suất đồng cỏ, nâng cao năng suất chăn nuôi và tổng hợp lại là nâng cao hiệu quả kinh tế chăn nuôi. Keo giậu còn được trồng để sản xuất bột lá keo giậu; ở một số nước, sản xuất bột lá keo giậu đã trở thành một ngành liên hợp nông - công nghiệp vừa cung cấp thức ăn cho gia súc trong nước vừa xuất khẩu ra nước ngoài. Lá keo giậu có ưu điểm là tỷ lệ protein và caroten cao, tỷ lệ xơ thấp, phơi khô nhanh, dễ nghiền thành bột; tỷ lệ protein trong lá không thua kém bất cứ cây thức ăn gia súc họ đậu nào. Trên đây là các lý do làm cho keo giậu được trồng khá phổ biến và được sử dụng rộng rãi cho nhiều đối tượng vật nuôi ở trên thế giới.

Tuy nhiên, trong keo giậu có chứa độc tố mimosin, vật nuôi ăn thức ăn có chứa mimosin với hàm lượng cao hoặc với hàm lượng thấp trong thời gian dài sẽ bị ảnh hưởng xấu đến sức khỏe và khả năng sản xuất của chúng. Chính vì vậy, các nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu về độc tố này trong cây keo giậu như: cấu trúc hóa học, cơ chế gây độc, phương pháp loại bỏ độc tố trong thức ăn và tỷ lệ bột lá keo giậu phối hợp vào thức ăn hợp lý, đảm bảo được sức khỏe và năng suất của vật nuôi.

4.1. Chất độc mimosin trong keo giậu

4.1.1. Công thức hóa học và cơ chế gây ngộ độc

Tên hóa học của mimosin là β - [N (3- hydro - 4 oxypyridyl)] - α - amino propionic axit.

Công thức hóa học: $C_8H_{10}N_2O_4$

Cấu trúc hóa học của mimosin như sau:

Hình 4.1 Cấu trúc hóa học của mimosin

Do mimosin có ảnh hưởng xấu đến gia súc, gia cầm nên nó là yếu tố hạn chế trong việc sử dụng các loại thức ăn có chứa mimosin trong chăn nuôi. Vì vậy, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu về độc chất này, đặc biệt là quá trình tổng hợp, phân hủy và tác động của mimosin đối với cơ thể động vật. Do cơ chế gây độc của mimosin khá phức tạp nên các tác giả chưa làm rõ được cơ chế này mà chỉ đề ra các giả thuyết từ các kết quả nghiên cứu. Tổng hợp các giả thuyết về tác động của mimosin như sau:

Mimosin có tác động tới quá trình trao đổi các axit amin có cấu tạo mạch vòng tương tự như nó. Ví dụ, do có cấu trúc giống L - thyrosin mà mimosin có thể gây ra các tác động tương tự hoặc ngược lại với thyrosin. Nếu tác động ngược lại thì nó sẽ gây ức chế sinh tổng hợp protein và sẽ gây ra hiện tượng động vật chậm sinh trưởng. Người ta thấy khi động vật ăn thức ăn có chứa mimosin với khối lượng lớn và kéo dài thì hàm lượng thyrosin trong huyết thanh thấp. Thiếu hormon này là một trong những nguyên nhân dẫn đến động vật sinh trưởng chậm (Lin và cs., 1964, 1965; Ter Meulen và cs., 1981; Serrano và cs., 1983; Jones và Winter, 1979 - 1980).

Mimosin tác động đến các enzym có liên quan đến kim loại, đặc biệt là các enzym có chứa cation sắt, làm ức chế một số phản ứng sinh học của các enzym này. Tác nhân chính tác động đến enzym là “cái càng” của nhóm chứa 3 - hydroxy - oxo của vòng pyridon trong mimosin (Tsai và Ling, 1972, 1979; Hashiguchi và Takashi, 1977).

Mimosin có tác động tới các enzym như một chất đối kháng với vitamin B6 (photpho pyridoxal) mà các enzym này muốn hoạt động được phải có photpho pyridoxal. Như vậy mimosin đã gián tiếp ức chế các enzym.

Ví dụ, như các enzym synthetaza cystathionin và cyctsthionaza trong gan chuột, các enzym tham gia vào quá trình tổng hợp cystein từ methionin. Mimosin đã gián tiếp ức chế các enzym này làm cho quá trình tổng hợp cystein bị đình trệ dẫn đến ảnh hưởng tới số lượng, chất lượng lông của động vật (lông thưa, rụng lông) (Lin và Ling, 1962; Lin và Tung, 1966; Fowden và cs., 1967; Hylin, 1969; Grove và cs., 1978). Tuy nhiên, một số nhà nghiên cứu khác lại cho rằng độc tính của mimosin là do tác động giữa nó và photpho pyridoxal gây ra (Yang và Ling, 1968; El - Harith, 1981), như mô tả ở hình 4.2

Hình 4.2. Phức chất tạo thành do tác động giữa mimosin và photpho pyridoxal

Nguồn: Sethi và Kulkarni, 1995

Mimosin có tác động đến ADN (axit deoxyribonucleic), ARN (axit ribonucleic) và ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Nếu đúng như vậy, thì nó có thể đã ức chế ngay từ giai đoạn đầu của quá trình sao chép tế bào ở chuột (Hegarty và cs., 1964; Tsai và Ling, 1971; Serrano và cs., 1983; Mosca và cs., 1992).

Mimosin ức chế tổng hợp hydroxy - prolin dẫn đến làm yếu đi quá trình tổng hợp collagen ở sụn phôi thai gà. Sự suy giảm collagen làm cho sụn bị mềm, các tổ chức khác (mao mạch, tử cung...) dễ bị rạn nứt, từ đó dẫn đến các triệu chứng như: xuất huyết mao mạch, thủng tử cung.

Mimosin có tác động đến hệ thần kinh: Bằng chứng là các con chuột được cho ăn thức ăn chứa mimosin với khối lượng lớn và kéo dài sẽ bị liệt chân sau, nhưng sau khi không cho ăn thức ăn chứa mimosin nữa thì hiện tượng này mất đi, chân sau của chuột lại hoạt động trở lại bình thường (Yoshida, 1944; Ter Meulen và cs., 1979).

4.1.2. Hội chứng bị ngộ độc mimosin ở động vật và liều lượng gây độc

Mimosin gây ra các hội chứng như: lông thưa, rụng lông, giảm tính thèm ăn, cường tiết nước bọt, sưng tuyến giáp, giảm khả năng sinh sản, giảm sinh trưởng (Ter Meulen và cs., 1979).

Hội chứng trên dễ dàng nhận thấy khi động vật dạ dày đơn ăn khẩu phần có chứa bột lá keo giậu lớn hơn 10% hoặc động vật nhai lại ăn khẩu phần ăn có chứa lớn hơn 30% bột lá keo giậu trong thời gian dài. Đối với bột của hạt keo giậu cũng xảy ra hiện tượng tương tự, gà được ăn thức ăn có chứa 15% bột hạt keo giậu trong 12 ngày thì tiêu thụ thức ăn của gà giảm, tăng khối lượng của gà cũng giảm (Proverbs, 1984; Kamada và cs., 1997).

Thức ăn có chứa 3,3g mimosin trong 1kg thức ăn đối với gà con và 4,9g đến 10g mimosin trong 1kg thức ăn đối với gà lớn thì khả năng tiêu thụ thức ăn của gà giảm hẳn và sinh trưởng cũng bị giảm rõ rệt (Ter Meulen và cs., 1984; D'Mello và Acamovic, 1984; Kamada và cs., 1997).

Tuy nhiên, các nhà khoa học nhận thấy rằng có tới 92% lượng mimosin ăn vào được thải ra ngoài. Điều đó chứng tỏ trong thức ăn có chứa mimosin (bột lá, bột hạt keo giậu...) thì nó không phải là yếu tố duy nhất gây giảm năng suất chăn nuôi. Tác động của mimosin đối với động vật cũng khác nhau, tùy thuộc vào từng lứa tuổi, loài gia súc. Ví dụ như: gà con mẫn cảm với mimosin tinh khiết hơn so với gà trưởng thành, gia súc dạ dày đơn mẫn cảm với mimosin hơn so với gia súc nhai lại (D'Mello và Acamovic, 1982a, 1989).

Keo giậu là thức ăn có chứa mimosin, nhưng lại được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi. Để sử dụng an toàn thức ăn này, người ta đã đưa ra khuyến cáo về tỷ lệ tối đa bột lá keo giậu trong khẩu phần và lượng tối đa mimosin ăn vào đối với gia súc gia cầm như sau:

Bảng 4.1. Tỷ lệ tối đa bột lá keo giậu trong khẩu phần ăn của động vật

Loại động vật	Tỷ lệ tối đa (% VCK khẩu phần)	Lượng mimosin tối đa ăn vào (g/kg KL/ngày)
Bò	20 - 30	0,18
Dê	10 - 20	0,18
Cừu	10 - 20	0,14
Thỏ	10 - 15	0,23
Lợn	7 - 10	0,15
Gà đẻ	4 - 6	0,21
Gà thịt	4 - 6	0,16

Nguồn: Szyska và cộng sự, 1983

4.2. Mimosin trong cây keo giậu

Mimosin có trong một số cây thức ăn gia súc, nhưng chỉ có các sản phẩm từ cây keo giậu (lá tươi, bột lá keo giậu, bột cây keo giậu) được sử dụng rộng rãi và với khối lượng lớn trong chăn nuôi. Vì vậy, cần phải hiểu rõ về mimosin trong cây thức ăn này. Hàm lượng mimosin trong cây keo giậu biến động rất lớn theo loài, giống, các giai đoạn sinh trưởng, các bộ phận khác nhau của cây, khoảng cách thu hoạch, dinh dưỡng đất và phân bón, phương pháp chế biến.

Hàm lượng mimosin biến động mạnh theo loài. Cụ thể: Hàm lượng này trong loài *L. macrophylla* là 5,4% vật chất khô (VCK), trong loài *L. diversifolia* là 2,0% đến 2,8% VCK, trong loài *L. lanceolata* là 6,2% VCK. Cây lai giữa loài *L. diversifolia* với loài *L. leucocephala* có hàm lượng mimosin từ 2,0% đến 3,8%. Trong cùng một loài hàm lượng mimosin cũng có sự biến động lớn. Ví dụ: *L. pulverulenta* có hàm lượng mimosin biến động từ 2 - 5%, đối với *L. gregii* là 1 - 2%, còn đối với *L. leucocephala* từ 3 - 9%. Trong loài *L. leucocephala* thì lượng mimosin của giống *L. leucocephala* 18 là thấp nhất (Rushkin 1977; Krishnamurthy và cs., 1983; Chandrasekaran và cs., 1981; Kewalramani và cs., 1987; Hauad Marroquin và cs., 1991).

Hàm lượng mimosin có sự biến động lớn giữa các bộ phận của cây. Các nhà nghiên cứu khác nhau đã cho biết tỷ lệ mimosin lá non là: 5,1%; 6,8% và 8,6%, trong chồi, búp non là: 4,9%, 12%, trong lá trưởng thành là: 3,0%, trong cuống lá là: 1,8% và 3,8%, trong cành là: 2,2%, trong vỏ quả tươi là: 2,4% và 3,7%, trong hoa là: 3,7%, trong hạt là: 5,9%; 7,2% và từ 3,3% đến 14,5% VCK. Trong hỗn hợp cành và lá là: 2,4% và trong bột lá là: 4,3% VCK. Nhìn chung, trong các bộ phận của cây thì mimosin có tỷ lệ cao ở trong hạt, sau đó đến lá non, búp non, tỷ lệ này thấp hơn ở trong thân, cành, lá trưởng thành của keo giậu (Akbar và Gupta và cs., 1986; D'mello và Acamovic, 1989; Wong và wan Zahari, 1995; Garcia và cs., 1996).

Hàm lượng mimosin trong các bộ phận của cây có sự biến động giảm theo sự phát triển của cây. Hàm lượng mimosin đạt cao nhất khi lá được 13 ngày tuổi là: 7,1% VCK, lúc 45 ngày tuổi là: 6,0% VCK, còn lúc 60 ngày tuổi là: 4,2% VCK. Hàm lượng mimosin có tương quan rất chặt chẽ với tuổi của lá. Nhìn chung các bộ phận non của cây có hàm lượng mimosin cao hơn các bộ phận già, nhưng trong toàn bộ quá trình phát triển của cây thì cây non có hàm lượng mimosin thấp hơn cây già (Ronja và cộng sự, 1979; Gupta và cộng sự, 1984; Deshumkh và cộng sự, 1987; Hauad Marroquin và cộng sự, 1991; Gupta và cộng sự, 1992).

Hàm lượng mimosin trong cây biến đổi theo mùa. Mùa nóng hàm lượng mimosin trong cây tăng, ngược lại vào mùa đông hoặc đầu mùa xuân lại giảm xuống (Hauad marroquin và cộng sự, 1991; Gupta và cộng sự, 1992).

Hàm lượng mimosin giảm khi khoảng cách giữa các lứa thu hoạch tăng. Bởi vì, hàm lượng mimosin trong cây tỷ lệ nghịch với tuổi của các bộ phận trong cây (cành, lá già có tỷ lệ mimosin thấp hơn so với cành, lá non) (Takahashi và Ripperton, 1949).

4.3. Phương pháp hạn chế và loại bỏ mimosin trong thức ăn

4.3.1. Sự phân giải mimosin trong cơ thể động vật và trong cây

Trong cơ thể động vật, mimosin và các chất trung gian của quá trình trao đổi mimosin và DHP dễ bị phân giải, đào thải ra ngoài. Quá trình phân giải này được minh họa bằng hình 4.3 dưới đây (Nguồn: Sethi và Kul Karni 1995):

Đối với gia súc nhai lại, việc phân giải mimosin thành DHP hầu như là triệt để dưới tác động enzym trong dạ cỏ, còn đối với gia súc dạ dày đơn thì lại khác, các enzym phân giải mimosin thành DHP bị ức chế bởi nồng độ axit cao của dạ dày cho nên sự phân giải bị hạn chế, nhưng quá trình này vẫn có thể được xảy ra sau khi tiêu hóa hấp thu theo sơ đồ ở hình 4.3. Đây là lí do của việc sử dụng bột lá keo giậu với tỉ lệ thấp trong khẩu phần của động vật dạ dày đơn.

Theo nguyên lý trên thì động vật nhai lại ít chịu tác động của mimosin, bởi vì vi sinh vật dạ cỏ và enzym tự nhiên trong lá keo giậu đã phân giải mimosin thành DHP. Tuy nhiên, DHP vẫn có tác động xấu đến tuyến giáp trạng của động vật có vú. Vì vậy, khi trâu, bò ăn lượng lớn lá keo giậu trong thời gian dài vẫn thấy hội chứng rụng lông, giảm tính thèm ăn, sinh trưởng chậm.

Riêng đối với gia cầm, ảnh hưởng của DHP là không rõ rệt. Do đó, tăng cường quá trình phân giải mimosin thành DHP có thể tăng được tỉ lệ bột lá keo giậu trong khẩu phần ăn của gia cầm. Nhưng, một số nhà nghiên cứu vẫn cho rằng DHP làm giảm tính thèm ăn của gia cầm. Vì vậy, vẫn nên phối hợp bột lá keo giậu trong khẩu phần ăn gia cầm với tỷ lệ phù hợp (Christie và cs., 1979, Lowry, 1981; Jones và Megarrity, 1983; Tangendjaja và Lowry, 1984; D'Mello và Acamovic, 1989).

Hình 4.3. Con đường trao đổi mimosin

Ghi chú: M: mimosin; 3,4 - dihydroxy pyridin, MN: mimosinamin; MA: mimosin acid

Ở trong cây, một phần mimosin được chuyển hóa thành DHP (3,4 - dihydropyridine) nhờ enzym; người ta tìm thấy enzym này trong lá non và vỏ quả non (dạng tươi) của cây keo giậu; không thấy enzym này ở vỏ quả già, cuống lá, hạt và mạch ngoại vi (Smith và Fowden 1966; Lowry 1981,1983).

Sau khi thu hoạch, mimosin tiếp tục bị phân hủy thành DHP. Sự chuyển hóa mimosin thành DHP chỉ xảy ra khi có sự tiếp xúc trực tiếp giữa mimosin và enzym, dưới sự tác động của các yếu tố như là nhiệt (sấy, phơi nắng, ngâm nước nóng), ngâm trong nước, nghiền, gia súc nhai thức ăn... Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khi ngâm lá keo giậu tươi trong nước ấm 40⁰C và mức pH = 7 trong 4 phút thì có tới 50% mimosin chuyển thành DHP, còn ngâm trong nước nóng 70⁰C trong thời gian 15 phút thì có trên

80% mimosin bị phân giải. Enzym sẽ ngừng hoạt động khi $\text{pH} < 4$ và khi nhiệt độ $> 70^{\circ}\text{C}$ hoặc khi sấy với nhiệt độ cao và thời gian quá ngắn (Hegarty và cs., 1964b; Lowry, 1981; Tangendjaja và Lowry, 1984; Lyon, 1985; Wee và Wang, 1987).

4.3.2. Các phương pháp hạn chế và loại bỏ mimosin

Tuy mimosin có tỷ lệ trong lá keo giậu tươi khá cao (3%-5% VCK) nhưng nó rất dễ bị loại bỏ bằng các phương pháp xử lý dưới đây.

Hiện nay, người ta đã sử dụng các biện pháp dưới đây để hạn chế hoặc loại bỏ mimosin trong thức ăn của vật nuôi. Sử dụng nhiệt (sấy khô, phơi nắng, ngâm nước nóng) là phương pháp đơn giản nhất nhưng có thể loại bỏ được hầu hết mimosin. Nhiệt độ cao vừa có tác dụng kích thích enzym phân giải mimosin hoạt động vừa tác động trực tiếp đến mimosin. Một điều cần lưu ý là khi sấy nhiệt độ quá cao và thời gian ngắn thì làm mất đi quá trình phân giải mimosin của enzym và làm biến tính protein của thức ăn. Trong phương pháp sấy thì sấy bằng hơi nước nóng (sấy ướt) hoặc ngâm lá keo giậu trong nước nóng rồi đem sấy thì sẽ loại bỏ được mimosin triệt để hơn (Hegarty và cs., 1964; National Academy of Science, 1977; Ter. Meulen và cs., 1979; Bengé và Curant, 1981; Akhbar và Gupta, 1984; Kale, 1987; Sethi, 1989; Mali và cs., 1990).

Ngâm nước cũng loại bỏ được mimosin. Ngâm lá keo giậu trong nước bình thường ở nhiệt độ trong phòng, trong 24 giờ loại bỏ được 97% mimosin. Nếu ngâm nước nóng thì loại bỏ mimosin nhanh hơn và triệt để hơn so với ngâm nước lạnh. Ngâm trong dung dịch nước xi măng có $\text{pH}=8$, nhiệt độ 45°C trong 10 phút có thể phá hủy hầu hết mimosin, phương pháp này có nhược điểm là tốn công, thời gian (ngâm nước xong mới đem đi phơi sấy) và quá trình ngâm nước, đặc biệt là ngâm nước nóng sẽ làm mất đi một lượng đáng kể protein hòa tan của lá (Labadan, 1969; Ter. Meulen và cộng sự, 1979; Padmavathy và Shobha, 1987; Soedarjo và Bortharkur, 1996).

Riêng đối với hạt và vỏ quả keo giậu, xay nhỏ trước khi phơi, sấy sẽ loại bỏ được mimosin nhiều hơn là không xay. Xay nhỏ loại bỏ được khoảng trên 20% mimosin, xay nhỏ sau đó sấy thì hầu hết mimosin được loại bỏ. Bởi vì, xay nhỏ đã làm tăng khả năng tiếp xúc của men phân giải với mimosin và tăng khả năng bay hơi mimosin khi phơi sấy (Wee và Wang 1987; Soedarjo và Bortharkur 1996).

Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu loại bỏ mimosin bằng hóa chất. Axetat natri là hóa chất xử lý mimosin hiệu quả nhất; sử dụng dung dịch này có thể loại bỏ tới 95% mimosin. Tiếp theo là dung dịch natri cacbonat, dung dịch này có thể loại bỏ tới 88% mimosin, dung dịch ure có thể loại bỏ tới 80% mimosin. Các nhà khoa học còn nghiên cứu sử dụng một số muối sắt và kẽm hoặc bazơ để khử mimosin. Ví dụ như FeSO_4 2%, ZnSO_4 2%, NaOH 0,5M trộn hoặc pha vào bột lá keo giậu. Cơ chế làm giảm đặc tính của mimosin là ion kim loại đã tạo thành phức chất bền vững với mimosin làm mất tính độc của mimosin

(Yoshida, 1944; Labadan, 1969; Lopez và cs., 1979; Ter. Meulen và cs., 1979. Tsai và Ling, 1973; Tawata và cs., 1986; Murthy và cs., 1994).

Tuy nhiên, cũng có một số tác giả không đồng tình với giả thuyết tạo phức bền vững giữa ion kim loại và mimosin nêu trên (Perez-Gil và cs 1987; Sethi 1989).

Ủ xanh thức ăn là một biện pháp có hiệu quả làm giảm mimosin trong lá keo giậu. Mimosin giảm là do sự lên men của vi khuẩn lactic; vi khuẩn này sinh sản ra trong quá trình ủ xanh thức ăn và đạt được cực đại sau khoảng 4 đến 6 tuần ủ. Phần lớn mimosin bị phân hủy sau 6 tuần ủ. Vì vậy, mimosin trong thức ăn ủ xanh tỷ lệ nghịch với thời gian ủ hay nói chính xác hơn là tỷ lệ nghịch với vi khuẩn lactic được sinh sản trong thức ăn ủ xanh (Rosas và cs., 1980a; Khatta và cs., 1987; Sethi và Kulkarni, 1995).

Một hướng chủ động và tích cực là lai tạo giữa các giống keo giậu để tạo ra cây lai có hàm lượng mimosin thấp nhưng lại có tỉ lệ protein cao. Lai tạo giữa *L.leucocephala* và *L.pulverulenta* thì cây lai có hàm lượng mimosin thấp hơn nhiều so với giống bố mẹ, nhưng hàm lượng protein lại cao hơn nhiều. Không thấy ảnh hưởng độc của mimosin đối với dê khi được ăn lá của cây lai này (Morito và cộng sự, 1977).

Khi công nghệ vi sinh phát triển, các nhà nghiên cứu đã đi theo hướng phân lập và nhân giống các vi sinh vật và đưa vào trong dạ cỏ của gia súc nhai lại theo con đường thức ăn nước uống. Cụ thể là: ở Úc, người ta phân lập và nhân giống vi khuẩn *Leucanaceae Rumenbug*, vi khuẩn này có khả năng phân giải mimosin và đưa chúng vào dạ cỏ động vật nhai lại để khử độc tính của mimosin. Công nghệ này cũng được áp dụng từ năm 1986 ở Venezuela, các nhà khoa học đã phân lập và nhân giống được các vi sinh vật nói trên có khả năng phân giải DHP. Như vậy, mimosin sẽ được vi sinh vật dạ cỏ phân giải, còn DHP sẽ được các vi sinh vật nói trên phân giải. Kết quả này đã cho phép sử dụng khẩu phần có chứa 100% keo giậu mà động vật nhai lại vẫn không bị ngộ độc.

4.4. Các nghiên cứu về sử dụng keo giậu trong chăn nuôi

Keo giậu có tính thích nghi rộng rãi ở nhiều vùng đất và khí hậu khác nhau, có năng suất lá cao, giàu protein, vitamin và các chất dinh dưỡng khác. Vì vậy, keo giậu được trồng và sử dụng làm thức ăn chăn nuôi ở nhiều nước trên thế giới. Nhưng trong keo giậu lại chứa mimosin, một chất gây độc cho gia súc, gia cầm. Chính vì vậy, nhiều nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu đến hiệu quả sử dụng của keo giậu trong chăn nuôi và tỷ lệ an toàn của keo giậu trong khẩu phần ăn của gia súc, gia cầm để khuyến cáo cho người chăn nuôi.

4.4.1. Các nghiên cứu trên gia súc nhai lại

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tổng khối lượng thịt tăng từ 1 ha trồng xen giữa keo giậu với cỏ hòa thảo lớn hơn nhiều so với chỉ có cỏ hòa thảo trồng thuần. Cụ thể là tại miền Nam Queensland người ta đã nhận thấy những con bò được chăn thả trên những

cánh đồng cỏ trồng xen keo giậu với hòa thảo có mức tăng khối lượng cao hơn từ 50% đến 100% so với bò được chăn thả trên đồng cỏ trồng thuần cỏ “Siratro”, một loại cỏ tốt nhất của địa phương. Các nhà khoa học còn nhận thấy khối lượng của bò thịt tăng lên theo tuyến tính với tỉ lệ của keo giậu trên đồng cỏ. Chưa từng xảy ra hiện tượng bò bị ngộ độc mimosin khi chăn thả chúng trên đồng cỏ trồng xen giữa keo giậu và hòa thảo (Chee và Devendra, 1983; Tones và cộng sự, 1983).

- Các nhà khoa học đã không thấy biểu hiện trâu, bò bị ngộ độc mimosin khi bổ sung keo giậu tới 50% VCK của khẩu phần, trái lại chúng đều tăng khối lượng cao hơn so với đối chứng. Vì vậy, người ta khuyến cáo mức bổ sung keo giậu tươi hợp lý cho trâu, bò thịt là từ 20% đến 30% khẩu phần. Nếu trong điều kiện khẩu phần ăn nghèo protein thì có thể bổ sung từ 30% đến 50% khẩu phần. Keo giậu đã làm tăng hàm lượng protein trong khẩu phần, giúp cho bò thu nhận được nhiều vật chất khô và giúp cho tiêu hóa chất xơ tốt hơn (Humphrey, 1974; Moran 1982; Szyszka, 1983 và 1984; Minson, 1990; Norton, 1994).

- Các nhà khoa học đã nghiên cứu bổ sung 10% keo giậu tươi và 20,5% bột lá keo giậu (tính theo VCK) trong khẩu phần ăn của bò sữa. Năng suất sữa bò cao hơn là đối chứng ăn khẩu phần không có keo giậu, đặc biệt tỷ lệ mỡ sữa cao hơn và sữa có màu vàng sáng của caroten. Người ta còn nhận thấy khẩu phần ăn có chứa keo giậu còn cải thiện khả năng sinh sản của bò sữa (Ghatnekar và cs., 1983; NAS, 1984; Nguyễn Ngọc Hà, 1996).

4.4.2. Các nghiên cứu trên gia súc dạ dày đơn

Nghiên cứu cho lợn ăn thức ăn hỗn hợp có chứa 5%, 10%, 15%, 20% bột lá keo giậu, không cân đối lại năng lượng, kết quả cho thấy lợn của lô được bổ sung 5% và 10% vẫn tăng trọng cao hơn, tiêu tốn và chi phí thức ăn thấp hơn lô đối chứng (ăn thức ăn hỗn hợp không có bột lá keo giậu), lô 15% gần tương đương lô đối chứng còn lô 20% thì các chỉ tiêu đều kém hơn so với lô đối chứng. Từ các nghiên cứu, người ta đề xuất tỷ lệ bột lá keo giậu hợp lý trong khẩu phần ăn của lợn là 10% nếu cân đối lại năng lượng khẩu phần thì có thể phối hợp bột lá keo giậu với mức cao hơn (Leche, 1974; Malynics và cs., 1974; Chee và Devendra, 1983; NAS, 1984; Từ Quang Hiến, 2008).

Các nghiên cứu sử dụng keo giậu làm thức ăn cho thỏ đã chỉ ra rằng nếu chỉ sử dụng lá keo giậu làm thức ăn xanh duy nhất cho thỏ thì thỏ sẽ chậm lớn, tỷ lệ ốm và chết cao. Nếu kết hợp keo giậu với các thức ăn xanh thông thường khác (rau lang, rau muống, cỏ tự nhiên....) thì thỏ sẽ sinh trưởng, tăng khối lượng tốt. Nuôi thỏ bằng thức ăn hỗn hợp có chứa 0%, 5%, 10%, 15% và 20% bột lá keo giậu thì lô thỏ được ăn thức ăn có chứa 5% bột lá keo giậu cao hơn lô đối chứng (0% bột lá keo giậu) và tiêu tốn, chi phí thức ăn thấp hơn đối chứng, còn lô được ăn thức ăn 15%, 20% bột lá keo giậu thì

tăng khối lượng kém hơn, tiêu tốn chi phí thức ăn cao hơn lô đối chứng. Như vậy, mức phối hợp bột lá keo giậu vào thức ăn hỗn hợp cho thỏ vào khoảng 10% là hợp lý (Tù Quang Hiẻn, 2008).

4.4.3. Các nghiên cứu trên gà

* Các nghiên cứu sử dụng bột lá keo giậu chưa qua xử lý nuôi gà thịt

Các nhà khoa học là Tạ An Bình (1973); Dương Thanh Liẻm (1981); Chen và Lai (1981); Tù Quang Hiẻn và cs (2008) đã làm thí nghiệm và khẳng định tỉ lệ bột lá keo giậu trong khẩu phần cho gà thịt thích hợp là 3% - 4%. Còn Hanif và cs (1985), D.Mello và cs (1987) khẳng định mức 5% bột lá keo giậu trong khẩu phần không ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng của gà.

Một số nhà khoa học đã thí nghiệm trên gà thịt với khẩu phần có chứa từ 0% đến 20% bột lá keo giậu và có kết quả là khẩu phần có chứa 12%, 12,5%, 15% bột lá keo giậu đã không gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng của gà. Khối lượng khi kết thúc thí nghiệm tương đương với lô đối chứng không có bột lá keo giậu. Từ đó, các nhà khoa học đã đề xuất có thể phối hợp vào khẩu phần ăn của gà thịt tới 15% bột lá keo giậu (Prasert và Sumon Pojun và cs., 1989; Hussian và cs., 1991; Acamovic và D'Mello, 1980; Bastarrachea và cs., 1980; Gulraiz và cs., 1991).

Tuy nhiên, cũng có những tác giả cho biết gà được ăn thức ăn có chứa 5% và 10% bột lá keo giậu đã giảm tăng trọng rõ rệt so với gà của lô đối chứng (thức ăn không có bột lá keo giậu) (D'Mello và cs., 1987; Nataman và Chandrasekaran, 1996).

Có các kết quả khác nhau về ảnh hưởng của các tỷ lệ bột lá keo giậu trong khẩu phần đến gà thịt như đã trình bày ở trên có thể do tuổi gà khác nhau, giống gà khác nhau sẽ có khả năng chịu đựng khác nhau với mimosin, giống keo giậu khác nhau sẽ có hàm lượng mimosin trong sản phẩm khác nhau và cuối cùng là có cân đối hoặc không cân đối năng lượng khi thay thế một phần thức ăn hỗn hợp bằng bột lá keo giậu. Để bảo đảm an toàn và luôn đạt được hiệu quả chăn nuôi cao thì chỉ nên phối hợp 3% đến 5% bột lá keo giậu chưa qua xử lý vào thức ăn hỗn hợp cho gà thịt.

* Các nghiên cứu sử dụng bột lá keo giậu đã xử lý nuôi gà thịt.

Thí nghiệm trên gà thịt với khẩu phần ăn có chứa các tỷ lệ bột lá keo giậu khác nhau (từ 0 đến 20% bột lá keo giậu) đã được xử lý bằng cách ngâm nước, kết quả cho thấy gà thịt được ăn khẩu phần có chứa trên 10% bột lá keo giậu đã giảm tăng trọng rõ rệt so với lô đối chứng. Tuy nhiên, màu sắc gà đạt điểm cao nhất ở lô có chứa 15% bột lá keo giậu (Chupong, 1989).

Một thí nghiệm khác trên gà thịt từ 0 đến 8 tuần tuổi, với khẩu phần ăn có chứa 20% bột lá keo giậu được xử lý bằng cách ngâm nước 12 giờ. Kết quả cho thấy không

có sự sai khác có ý nghĩa về tăng khối lượng và chuyển hóa thức ăn giữa lô gà này và lô đối chứng (thức ăn không chứa bột lá keo giậu) (Murthy và cs., 1994).

Thí nghiệm trên gà thịt với khẩu phần ăn có chứa bột lá keo giậu đã được xử lý bằng 12g FeSO₄ hoặc 2g NaOH, hoặc hỗn hợp 12g FeSO₄ + 2g NaOH/100g bột lá keo giậu hoặc FeCl₃ 5% ở nhiệt độ 80°C đến 90 °C trong 15 phút. Do đó gà được ăn khẩu phần có chứa bột lá keo giậu qua xử lý đã cải thiện rõ rệt về tăng trọng và hiệu quả qua sử dụng thức ăn so với gà được ăn khẩu phần có chứa bột lá keo giậu nhưng chưa qua xử lý (Moat, 1988; Gulraiz Ahmed, 1991).

*** Các nghiên cứu sử dụng hạt keo giậu nuôi gà thịt**

Thí nghiệm sử dụng 0%, 5%, 10%, 15% và 20% bột hạt keo giậu trong khẩu phần ăn của gà thịt từ 0 đến 8 tuần tuổi. Kết quả cho thấy tăng trọng và hiệu suất sử dụng của lô trong khẩu phần ăn chứa 5% bột hạt keo giậu cao hơn so với lô đối chứng, còn các lô gà được ăn thức ăn có 10% bột hạt keo giậu trở lên thì thấp hơn so với đối chứng, đặc biệt lô gà ăn thức ăn có chứa 20% bột hạt keo giậu thì tỉ lệ chết lên tới 25% (Sharif và cs 1995; Reddy và cs 1995).

Một thí nghiệm khác cũng bố trí tỷ lệ bột hạt keo giậu tương tự như trên, ngoài ra còn cân đối đồng đều về protein và năng lượng và bổ sung 0,3% FeSO₄. Nhưng kết quả cho thấy tất cả các lô gà ăn thức ăn có chứa bột hạt keo giậu đều có tăng trọng và chuyển hóa thức ăn kém hơn so với lô đối chứng (0% bột lá keo giậu) (Lee Bryant và Yong, 1982).

Thí nghiệm tách hạt keo giậu khỏi vỏ, sau đó ngâm nước, sấy và nghiền thành bột và phối hợp 10% bột hạt keo giậu đã tách vỏ nuôi gà thịt và gà sinh sản. Kết quả cho thấy không có ảnh hưởng xấu nào đến tăng trọng và chuyển hóa thức ăn của gà thịt và tỉ lệ trứng ấp nở của gà sinh sản (Bryant, 1980).

Một thí nghiệm khác sử dụng các khẩu phần có tỷ lệ 0%, 5%, 10%, 15% bột hạt keo giậu không tách vỏ nhưng được xử lý ngâm nước nuôi gà thịt Magnolia từ 0 đến 4 tuần tuổi, tăng trọng chuyển hóa thức ăn đạt cao nhất ở lô được ăn thức ăn có chứa 5% bột hạt keo giậu. Không thấy có ảnh hưởng xấu ở lô gà ăn khẩu phần có chứa 10% bột hạt keo giậu.

Như vậy, nếu bột hạt keo giậu chưa được xử lý thì chỉ nên phối hợp vào khẩu phần khoảng 5%, còn nếu đã qua xử lý (ngâm nước) thì có thể bố trí đến 10%. Với các mức này, gà sẽ được an toàn và tăng trọng, chuyển hóa thức ăn tương đương hoặc cao hơn so với gà của lô đối chứng được ăn thức ăn không chứa bột hạt keo giậu.

Nghiên cứu trên gà sinh sản

Nhiều thí nghiệm trên gà mái sinh sản đã khẳng định tỷ lệ 3% - 5% bột lá keo giậu trong khẩu phần ăn đã có ảnh hưởng tốt đến tăng trọng, tỉ lệ đẻ trứng, tỉ lệ trứng giống

của gà mái, tỉ lệ trứng có phôi, tỷ lệ trứng ấp nở, giảm tiêu tốn, chi phí thức ăn cho 10 trứng, đặc biệt làm tăng hàm lượng β caroten trong lòng đỏ trứng (Aquino, 1986; Austria, 1986; Nguyễn Ngọc Hà và cs., 1993; Từ Quang Hiển và cs., 2008).

Một số thí nghiệm khác cho thấy khẩu phần ăn có chứa 10% hoặc đến 20% bột lá keo giậu đã không gây ảnh hưởng xấu đến tăng trọng của gà mái cũng như năng suất và chất lượng trứng (Austria, 1986; Ekpenyong, 1989; Rakhee-Bhatnagar và công sự, 1996).

Tuy nhiên, có ý kiến cho rằng, tỉ lệ bột lá keo giậu cao sẽ ảnh hưởng đến tuổi thành thực về tính của gà mái vì mimosin là một trong các yếu tố ức chế thành thực ở gà mái. Spinghall, 1965; Rakhee-Bhatnagar 1996. Nhưng các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ 5% bột lá keo giậu trong khẩu phần không có ảnh hưởng xấu đến tuổi thành thực về tính của gà mái. (Tangendjaja và Sarmanu, 1986; Upase và Jadhav, 1994).

Như vậy, phối hợp khoảng 5% bột lá keo giậu trở lại trong thức ăn hỗn hợp của gà mái sinh sản sẽ đạt được hiệu quả cao, nhưng cũng có thể phối hợp tới 10% bột lá keo giậu mà vẫn không gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe, năng suất và chất lượng trứng của gà mái sinh sản.

Chương V

ĐỘC TỔ TRONG ĐẬU ĐỎ, KHOAI TÂY VÀ MỘT SỐ CHẤT CÓ THỂ GÂY ĐỘC

5.1. Độc tố trong đậu đỏ

5.1.1. Giới thiệu về cây đậu đỏ

Cây họ đậu rất phong phú và đa dạng, người ta đã phát hiện được khoảng 20.000 loài cây thuộc họ đậu, có khoảng 5% số này được nghiên cứu với mục đích sử dụng làm thức ăn cho người và vật nuôi.

Trong các cây họ đậu thì đậu tương đứng hàng đầu về diện tích trồng và sản lượng hạt. Hàng năm, tổng diện tích trồng đậu tương trên thế giới khoảng 76 triệu ha và sản lượng đạt khoảng 180 triệu tấn. Ở Việt Nam, diện tích trồng đậu tương khoảng 160 ngàn ha và sản lượng khoảng 200 ngàn tấn.

Trong khẩu phần ăn của vật nuôi dạ dày đơn, đậu tương và khô đậu tương chiếm vị trí thứ hai, chỉ sau bột hạt ngũ cốc và các thức ăn giàu bột đường. Hạt đậu đỏ nói chung, đậu tương nói riêng được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi, nhưng nó cũng có điểm hạn chế. Đó là trong hạt đậu đỏ có chứa các chất độc và các chất kháng dinh dưỡng. Các chất này gây độc hại đối với vật nuôi, làm giảm hiệu suất sử dụng thức ăn, gia súc chậm lớn và dẫn đến hiệu quả chăn nuôi giảm. Chính vì vậy, các nhà khoa học ngành chăn nuôi đã nghiên cứu chất độc trong hạt đậu đỏ, ảnh hưởng của chúng đối với vật nuôi, các phương pháp chế biến nhằm phân hủy chất độc và nâng cao giá trị dinh dưỡng của thức ăn đậu đỏ.

5.1.2. Các chất độc hại và tác động của chúng đối với vật nuôi

Các chất độc hại trong đậu đỏ được chia một cách tương đối thành 2 loại:

Loại gây độc trực tiếp đối với vật nuôi, ví dụ như saponin, axit cyanhydric Hemagglutinin.

Loại kháng dinh dưỡng: Các chất thuộc loại này chủ yếu là ức chế men tiêu hóa làm giảm khả năng tiêu hóa, hấp thu thức ăn của vật nuôi, ví dụ như chất kháng men trypsin, chất kháng men proteaza, chất tanin...

Sự phân loại trên chỉ là tương đối, trong thực tế có những chất vừa gây độc vừa kháng dinh dưỡng.

Người ta tìm thấy các chất độc hại trong hạt đậu đỏ như: Chất ngưng kết hồng cầu, chất sinh bướu cổ, chất chống đông máu, chất gây bệnh thiếu máu, chất kháng men chimotrypsin, trypsin, proteaza, chất sinh cyanua, saponin, tanin, alkaloid và một số

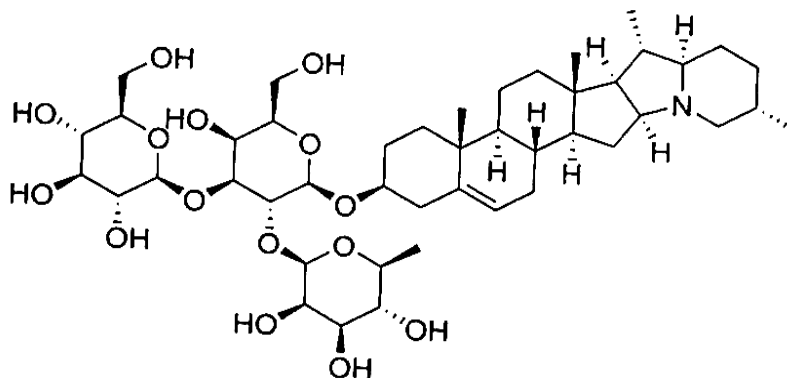
chất độc hại khác. Theo các tài liệu của Donald (1988), Francesh và cs (1990), Fullfat soya Handbook (1994), Peterson (1994) thì tác động của các chất độc hại trong đậu đỗ đến vật nuôi như sau:

5.1.2.1. Các chất gây độc

* Nhóm chất Hemagglutinin

Nhóm chất này có bản chất protein, có khả năng làm kết dính các tế bào hồng cầu, có thể gắn kết với tế bào niêm mạc ruột non làm giảm khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng. Tuy nhiên, tác động gây độc của nó không cao và nó cũng dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao. Vì vậy, đậu tương khi xử lý nhiệt thì không phải lo lắng về độc tố này.

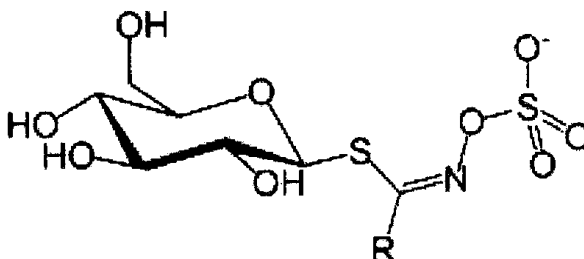
* Saponin:



Hình 5.1. Cấu tạo hóa học của Saponin

Saponin có bản chất glucosid, có vị đắng, có tính sát trùng mạnh, nó có thể hòa tan các tế bào hồng cầu, có thể phá hủy các màng niêm mạc, làm tăng bài tiết cholesterol và làm giảm sinh trưởng, nó cũng gây ức chế men trypsin nhưng không mạnh. Saponin còn làm tăng tính thấm của biểu mô đường hô hấp nên làm mất các chất điện giải cần thiết. Saponin trong đậu tương thấp nên cũng không đáng ngại khi sử dụng đậu tương làm thức ăn chăn nuôi.

* Nhóm chất Goitrogenic glycoside (Glucosinolates)



Hình 5.2. Cấu tạo hóa học của Goitrogenic

Cấu trúc cơ bản của Glucosinolate (trong đó R là một aglycone hữu cơ và một nhóm alkyl).

Glycosinolates được thủy phân bởi enzyme glucosinolase hoặc thioglucosidase thành glucose, HSO_4^- , và một trong những dẫn xuất aglycone sau đây: isothiocynates, thiocyanates, nitriles, hoặc các hợp chất liên quan như oxazolidine - 2 - thiones.

Trong đậu tương, nhóm này chiếm tỷ lệ rất thấp; nó có bản chất glucosid, có khả năng làm tăng sinh tuyến giáp; chính vì vậy nó làm cho vật nuôi chậm lớn, còi cọc. Vì chúng chiếm tỷ lệ rất thấp nên cũng không đáng lo ngại.

*** Nhóm chất Allergin**

Nhóm chất này có bản chất protein, có thể gây dị ứng đối với vật nuôi và kìm hãm sự phát triển độ dài của lông nhung ruột. Lợn con mẫn cảm cao với nhóm chất này, vì vậy người ta thấy sự giảm sinh trưởng ở lợn con khi cho ăn đậu tương chưa qua xử lý kéo dài. Gia cầm ít mẫn cảm với nhóm chất này, vì thế nó không gây tổn hại trong chăn nuôi gia cầm. Nhóm chất này tương đối bền vững với nhiệt, xử lý nhiệt bình thường thì nó vẫn tồn tại trong đậu đỗ.

*** Ureaza, lipoxigenaza**

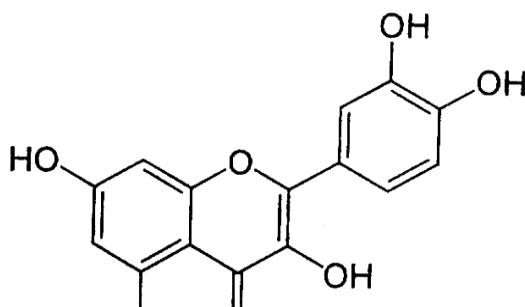
Các chất này được giải phóng ra từ tế bào chứa dầu khi nghiền hạt đậu đỗ, nó thúc đẩy quá trình oxy hóa axit béo, gây ảnh hưởng xấu tới quá trình trao đổi chất trong cơ thể và quá trình sinh trưởng của vật nuôi. Các chất này có hàm lượng rất nhỏ trong hạt đậu đỗ và dễ bị phá hủy bởi nhiệt độ nên không đáng lo ngại về các chất này.

*** Phytoestrogen**

Chất này có tác động giống như hormone oestrogen. Bởi vì nó có hàm lượng rất thấp và có thể gây bất lợi nhưng cũng có thể là có lợi cho quá trình trao đổi chất của cơ thể động vật, nên ảnh hưởng của nó đối với vật nuôi không rõ rệt.

Xử lý nhiệt thông thường thì nó vẫn tồn tại trong đậu, đỗ.

*** Phenols (phenolic)**



Hình 5.3. Cấu tạo hóa học của Phenols

Phenol có cấu tạo phân tử gồm nhóm hydroxyl (- OH) và nhóm hydrocacbon thơm (C_6H_5OH).

Phenol có thể làm tăng cholesterol máu, phá hủy tiền vitamin nhóm B, nó cũng có tác dụng giống như hoocmon sinh dục cái oestrogen.

5.1.2.2. Các chất kháng dinh dưỡng

Nhóm chất ức chế enzym tiêu hóa

Nhóm chất này có bản chất protein, có khả năng liên kết với các enzym tiêu hóa protein như trypsin, chymotrypsin, proteaza và làm mất khả năng hoạt động của các enzym này, từ đó dẫn đến giảm khả năng tiêu hóa protein của vật nuôi. Sự liên kết giữa nhóm chất này với enzym dẫn đến các phản ứng sinh lý của cơ thể, đó là tăng sinh tuyến tụy để tăng cường sản xuất enzym tiêu hóa và làm cơ thể thiếu hụt các axit amin chứa lưu huỳnh như methionin, cystin, do các axit amin này bị huy động vào việc tăng sản xuất các enzym tiêu hóa protein. Từ các nguyên nhân này dẫn đến giảm hiệu suất chuyển hóa thức ăn, giảm tốc độ sinh trưởng của vật nuôi, tăng tiêu tốn và chi phí thức ăn cho một đơn vị sản phẩm.

Nhóm chất Rachitogenic

Nhóm chất này cản trở quá trình hấp thu canxi dẫn đến vật nuôi bị mềm, xẹp xương, vỏ trứng bị mềm do thiếu canxi. Gia cầm và đặc biệt là gà tây mắc cảm cao với nhóm chất này, gia súc thường ít mắc cảm hơn.

Nhóm chất kết dính kim loại

Nhóm chất này có khả năng làm cho một số chất khoáng như mangan, đồng, sắt kết hợp với protein và axit phytic tạo thành phức chất khó hấp thu. Từ đó dẫn đến giảm tỷ lệ hấp thu khoáng và làm yếu đi một số quá trình sinh học liên quan đến các khoáng này, gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của vật nuôi.

Phytin ($C_6H_6(H_2PO_4)_6$)

Hình 5.4. Công thức cấu tạo hóa học của Phytin

Phytin được tổng hợp từ hexaphosphat và inozitol. Nó làm cho phốt pho trong đậu tương bền vững với nhiệt, trở thành phốt pho khó tiêu, làm giảm tiêu hóa hấp thu

khoáng vi lượng, làm ảnh hưởng xấu tới quá trình trao đổi chất ở động vật dạ dày đơn. Phytin dễ bị phân hủy bởi men phytaza, vì vậy, bổ sung men này cho vật nuôi vừa giúp phân hủy phytin vừa làm tăng phốt pho dễ tiêu, đồng thời làm giảm ô nhiễm môi trường.

Nhóm các chất được tạo ra do xử lý đậu đỗ ở nhiệt độ cao

Khi xử lý đậu tương ở nhiệt độ cao đã tạo ra phản ứng giữa các chất hydratcacbon với các axit amin tự do trong hạt đậu tương, đặc biệt là với lysine và histidin, tryptophan tạo ra các hợp chất bền vững với enzym tiêu hóa. Phản ứng này gọi là melanoidin hay maillard. Do phản ứng tạo thành hợp chất bền vững đã dẫn đến giảm tiêu hóa, hấp thu các axit amin tham gia vào phản ứng này và hậu quả là vật nuôi thiếu hụt các axit amin đó ngay cả khi chúng có mặt đầy đủ trong thức ăn. Ngoài phản ứng nêu trên, khi xử lý nhiệt có thể còn xảy ra việc sắp xếp lại cấu trúc hóa học của một số axit amin và tạo thành các chất mới được gọi là Amadori. Việc tạo thành các chất này cũng làm tiêu hao đi một số axit amin và hậu quả của nó cũng giống như các chất tạo ra từ phản ứng maillard. Các chất mới này ít tan trong kiềm, bởi vậy người ta dùng phản ứng hòa tan của protein trong KOH để định lượng các chất mới này. Không cần lo lắng về các chất nêu trên nếu xử lý đậu tương với nhiệt độ theo đúng quy trình.

Chất oligosaccharide

Chất này được hình thành trong quá trình bảo quản đậu đỗ, đặc biệt là bột đậu đỗ. Nó là tổng hợp của các đường raffinosa 14%, stachyosa 5,2%, sucroza 6,2% và verbascosa. Những chất này rất dễ lên men sinh hơi do đó nó làm rối loạn quá trình tiêu hóa. Các chất này ít chịu tác động của nhiệt vì vậy người ta phải chiết xuất riêng nó từ bột hạt đậu, đỗ. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các chất này không lớn nên không đáng lo ngại.

5.1.3. Một số phương pháp xử lý đậu tương

5.1.3.1. Mục đích, nguyên lý và tác động của xử lý đối với đậu tương

Mục đích của việc xử lý đậu tương:

Phá hủy hoặc làm giảm các chất độc và các chất kháng dinh dưỡng trong hạt đậu tương

Làm tăng giá trị dinh dưỡng của đỗ tương

Nguyên lý của việc xử lý là dựa vào tác động cơ học, lý học (nhiệt), hóa học làm thay đổi đặc tính vật lý, cấu trúc tế bào của hạt, đồng thời cũng tác động tới các chất dinh dưỡng và các chất độc hại trong hạt đậu đỗ làm cho các chất dinh dưỡng trở nên dễ tiêu hóa hấp thu hơn, còn các chất độc hại bị phân hủy hoặc giảm bớt nồng độ.

Theo Grigorev (1981); Bùi Đức Lũng và cs (1995); Trần Quốc Việt (1998) thì xử lý hạt đậu tương đã có những tác động như sau.

* Tác động tốt

Tác động cơ học làm vỡ vụn hạt đậu, làm tăng tiếp xúc của các enzym tiêu hóa đối với thức ăn, đồng thời có thể giải phóng các chất độc hại làm cho chúng tăng tiếp xúc với các tác nhân phân hủy chúng.

Tác động của nhiệt (hấp, sấy, rang) làm giảm nhanh lượng nước trong tế bào hạt, tạo ra các vết nứt vi thể trong hạt, làm cho các enzym thâm vào tế bào dễ dàng, đồng thời các chất độc hại cũng thoát ra dễ dàng.

Tác động nhiệt bằng cách nấu chín, hấp bằng hơi nước sẽ tạo ra quá trình gelatin hóa tinh bột, làm tăng tỷ lệ tiêu hóa tinh bột. Quá trình này xảy ra như sau: Nước làm cho hạt trương lên, phá vỡ cấu trúc hóa học của tinh bột, đặc biệt là phá vỡ liên kết thứ cấp hydro giữa các chuỗi polyme của tinh thể tinh bột. Quá trình này xảy ra thuận lợi khi đun từ từ để duy trì nhiệt độ nước kéo dài ở một khoảng nhiệt độ thích hợp xác định. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình này gọi là nhiệt độ gelatin hóa. Nhiều tác giả khẳng định phương pháp chế biến có hơi nước (hoặc không có) đều làm tăng tốc độ phân giải tinh bột của enzym amilaza.

Tác động của nhiệt sẽ làm phá hủy hoặc làm giảm nồng độ của các chất độc và các chất kháng dinh dưỡng trong thức ăn, làm tăng hiệu quả thức ăn nói chung, tinh bột và protein nói riêng.

* Tác động xấu

Tác động nhiệt làm phân hủy một số vitamin, làm biến đổi cấu trúc hóa học của một số axit amin (lysin, tryptophan, cystin, cystein...) từ đó làm giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn.

Tác động nhiệt có thể gây ra sự tương tác giữa các nhóm cacboxyl tự do của protein với các nhóm oxamin của các axit amin khác nhau tạo ra liên kết chéo bền vững khó bị phân giải bởi các enzym tiêu hóa. Mặt khác, liên kết chéo này đã làm giảm đi các axit amin dễ tiêu.

Tác động nhiệt độ cao, kéo dài còn làm giảm độ dễ tiêu của axit amin, do tạo ra phản ứng đường amin, đó là phản ứng maillard, làm cho đồ tương có màu sẫm. Các nhà nghiên cứu đã khẳng định chiết dầu đậu tương bằng cơ giới và nhiệt độ cao đã làm giảm độ dễ tiêu của axit amin và giảm năng lượng trao đổi của thức ăn. Chất lượng khô dầu của phương pháp này kém hơn so với khô dầu của phương pháp chiết rút bằng dung môi hữu cơ.

5.1.3.2. Phương pháp chế biến và kiểm tra chất lượng đậu tương sau chế biến

5.1.3.2.1. Một số phương pháp chế biến đậu tương

Luộc chín: ngâm đậu tương trong nước thường trong khoảng 30 phút trước khi luộc, sau đó luộc chín, để ráo nước, phơi hoặc sấy khô và nghiền thành bột.

Hấp chín: ngâm đậu tương trong nước thường khoảng 30 phút, sau đó hấp chín cách thủy, phơi hoặc sấy khô và nghiền thành bột.

Rang chín: đậu tương được rang bằng chảo hoặc được rang trong trống quay (một thiết bị rất phổ biến dùng để sao chè); dùng nhiệt làm nóng trực tiếp trống quay hoặc thổi hơi nóng vào trống quay. Phương pháp rang thủ công có nhược điểm là khó điều chỉnh nhiệt độ và khó xác định đúng “điểm dừng” dẫn đến hạt đậu tương có thể bị cháy hoặc chưa chín; đậu tương cháy thì làm giảm tính ngon miệng của thức ăn, đậu tương sống thì chưa khử hết được chất độc và chất kháng dinh dưỡng. Người ta dùng phản ứng ureaza hoặc xác định độ hòa tan protein của đậu tương trong dung dịch KOH để xác định “điểm dừng” đúng lúc. Tuy nhiên, các phương pháp này chỉ ứng dụng cho nghiên cứu, còn trong thực tiễn khó áp dụng. Vì từ khi lấy mẫu thử và có kết quả thì đậu tương đã cháy rồi.

Sấy bằng vi sóng: Sử dụng sóng ngắn $3 \times 10^6 - 3 \times 10^{10}$ Hz. Hệ thống sấy bao gồm: một thiết bị tạo bức xạ nhiệt, tạo bức xạ trong phạm vi quang phổ 1,8 - 3,4 μm , một buồng sấy bằng gốm chịu nhiệt. Hạt đậu tương được đưa vào buồng sấy và được làm chín ở nhiệt độ 140°C - 150°C. Ưu điểm của phương pháp này là: nhiệt độ ổn định, chỉ cần xác định khoảng thời gian hạt đậu tương được lưu lại trong buồng sấy thì kết quả sấy của các mẻ là giống nhau, các chất dinh dưỡng trở nên dễ tiêu hóa hơn, tế bào chứa dầu bị phá vỡ và dầu trong tế bào được giải phóng ra nên dễ tiêu hóa hấp thu hơn, nhiệt độ cao đã giúp phân hủy chất độc, chất kháng dinh dưỡng triệt để hơn.

Phương pháp ép đùn: Dây chuyền sản xuất bao gồm hệ thống ép bằng áp suất cao làm cho hạt đậu tương bị vỡ vụn thành bột và một thiết bị cấp nhiệt ở 120°C - 130°C. Đây là một hệ thống liên hoàn, vừa xử lý chín hạt đậu tương vừa tạo thành bột đậu tương. Phương pháp này có ưu điểm là: thay đổi cấu tạo vật lý, hóa học của hạt đậu tương, tinh bột đậu tương được gelatin hóa tạo thành dextrin làm cho thức ăn dễ được tiêu hóa hấp thu hơn, các chất độc và chất kháng dinh dưỡng bị phá hủy triệt để hơn, chất lượng sản phẩm ổn định.

Ép dầu hoặc chiết xuất dầu đậu tương: Đây không phải là các phương pháp chế biến đậu tương làm thức ăn gia súc mà là các phương pháp chế biến dầu đậu tương làm thực phẩm cho con người, nhưng sản phẩm phụ của nó là khô dầu lại sử dụng làm thức ăn gia súc. Ép dầu là dùng lực cơ học hoặc áp suất cao làm vỡ hạt và tế bào chứa dầu của hạt để dầu được giải phóng ra và thu lấy dầu. Phương pháp này gồm các công đoạn: làm sạch hạt, rang nóng ở 70°C - 80°C, ép bằng trục quay hoặc áp suất cao (nhiệt độ có thể lên tới 120°C), nhờ đó tách dầu ra và còn lại là khô dầu. Cũng có thể thay thế việc rang đậu tương bằng phương pháp luộc hoặc hấp chín trước khi ép dầu. Chiết dầu đậu tương là dùng dung môi hữu cơ chiết lấy dầu. Phương pháp này gồm các công đoạn: làm sạch hạt, nghiền vỡ hạt, tách vỏ (hoặc không tách vỏ), chiết xuất dầu bằng dung môi hexan hoặc homologues cacbonhydrat, hấp hoặc sấy đậu tương đã tách dầu, nghiền thành bột; sản phẩm là khô dầu đậu tương đã tách vỏ hoặc chưa tách vỏ. Phương pháp chiết dầu

bằng dung môi hữu cơ đã làm tăng thêm khoảng 10% lượng dầu chiết xuất được, đồng thời làm tăng chất lượng khô dầu, đặc biệt là khô dầu đậu tương đã được tách vỏ trước khi chiết xuất dầu.

5.1.3.2.2. Kiểm tra chất lượng đậu tương được xử lý bằng nhiệt

Người ta dùng phương pháp định lượng hoạt lực của enzym ureaza trong đậu tương hoặc xác định độ hòa tan của protein đậu tương trong dung dịch KOH để xác định độ chín thích hợp của đậu tương, thông qua đó xác định thời gian xử lý thích hợp.

* Phương pháp xác định hoạt lực enzym ureaza.

Nguyên lý: trong hạt đậu tương chưa xử lý có chứa một lượng enzym ureaza nhất định, enzym này bị phá hủy trong quá trình xử lý nhiệt. Nếu đỗ tương được xử lý tốt thì enzym còn lại ít và ngược lại. Người ta định lượng enzym này thông qua hoạt lực phân giải ure của nó, từ đó xác định độ chín của đậu tương và được định lượng như sau:

Phương pháp thứ nhất:

Nguyên lý của phương pháp này là xác định hoạt lực của enzym ureaza trên cơ sở nó giải phóng NH_3 từ ure được tính thông qua số miligam nitơ sinh ra trong 1 phút của 1 gam sản phẩm trong môi trường nhiệt 30°C .

Các thiết bị cần có là máy đo pH với độ nhạy cao ($\pm 0,02$ pH) hoặc thiết bị potentiometric titration, máy khuấy từ, bể nước có điều khiển nhiệt độ chính xác hay còn gọi là bể ổn nhiệt (không chế nhiệt độ ở 30°C), ống kiểm tra có bầu thủy tinh 150×18 mm.

Các hóa chất cần có là axit clohydric (HCl 0,1 N), dung dịch NaOH 0,1N (hydroxit Natri) dung dịch đệm photphat 0,05M (pha chế từ 4,45 gam $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (photphat sodium) + 3,4 gam KH_2PO_4 (photphat monopotassium) + 1000 ml nước cất), dung dịch đệm ure (30 gam ure + 1000 ml dung dịch đệm photphat 0,05M). Dung dịch này có pH = 6,9 - 7,0.

Tiến hành thử nghiệm như sau: nghiền 10 gam đậu tương thành bột có kích thước 0,2 mm, cân chính xác 2 gam mẫu (chính xác đến 0,1 mg) cho vào ống kiểm tra (đã nói ở trên), cho vào 10 ml dung dịch đệm ure, nút ống kiểm tra và lắc đều, đặt ống kiểm tra vào bể nước 30°C , lắc nhẹ ống sau đó để ngâm trong 30 phút, lấy ống kiểm tra khỏi bể ngâm và bổ sung ngay 10 ml HCl 0,1 N, làm mát nhanh ống kiểm tra ở 20°C , chuyển dung dịch từ ống kiểm tra sang ống định lượng titration vessel của máy potentiometric titration, rửa ống kiểm tra 2 lần mỗi lần 2,5 ml nước cất, nước rửa cũng đổ vào ống định lượng titration vessel. Chuẩn độ ngay lập tức và thật nhanh bằng NaOH 0,1 N (sử dụng ống chuẩn độ electrometry) đến khi đạt pH = 4,7. Từ lượng tiêu hao NaOH 0,1 N để đạt đến pH = 4,7 sẽ tính được số mg nitơ được giải phóng ra.

Để tính được kết quả, cần kiểm tra một mẫu trắng (đối chứng) bằng cách cho 2g mẫu (cân chính xác đến 0,1 mg) vào ống kiểm tra, cho vào ống kiểm tra 10 ml HCl 0,1 N, sau đó cho vào 10 ml dung dịch đệm ure, đặt ống kiểm tra trong nước đá 30 phút, chuyển dung dịch mẫu trắng này sang ống định lượng titration vessel và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N cho đến khi đạt pH = 4,7 giống như trên.

Hoạt lực enzym ureaza trong 1g nitơ (N) của 1g mẫu, trong 1 phút ở điều kiện 30°C được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{14 \times C \times (v_0 - v_1)}{30 \times W}$$

V_1 là số ml NaOH 0,1 N tiêu hao khi chuẩn độ mẫu kiểm tra
 V_0 là số ml NaOH 0,1 N tiêu hao khi chuẩn độ mẫu trắng
 C nồng độ chính xác của dung dịch NaOH tính bằng ml/ l
 W là khối lượng VCK của mẫu tính bằng gam

Cần lưu ý: nếu hoạt lực của enzym ureaza > 1 mgN thì lượng mẫu có thể giảm xuống 50 mg, nếu tỷ lệ lipid thô trong mẫu > 10% thì phải chiết rút lipid trong điều kiện lạnh trước khi thử nghiệm.

Sau khi có kết quả thì đối chiếu với tiêu chuẩn của Hiệp hội đồ tương Hoa Kỳ, 1993 như sau: hoạt lực ureaza (mgN/1 phút ở 30°C) nếu > 0,5 thì đậu tương còn sống, từ 0,3 - 0,5 thì đậu tương chưa chín, từ $0,1 \leq 0,3$ thì đậu tương chín đủ độ, còn < 0,05 thì đậu tương chín quá (đậu tương bị cháy).

Phương pháp thứ hai dựa trên nguyên lý enzym ureaza phân giải ure giải phóng ra NH₃, khí NH₃ sinh ra sẽ làm chuyển màu thuốc thử, tùy theo nồng độ ureaza thấp hay cao sẽ gây lên sự chuyển màu nhiều hay ít, cụ thể là:

Bước 1 là chuẩn bị 4 loại dung dịch. Dung dịch 1 bao gồm 0,14g Fenol đỏ + 7 ml NaOH 0,1 N + 35 ml nước cất, dung dịch 2 gồm: 21 g ure + 300 ml nước cất, dung dịch 3 được tạo thành bằng cách trộn lẫn dung dịch 1 với 2 và đựng trong lọ thủy tinh màu. Dung dịch 4 được tạo thành bằng cách chuẩn độ dung dịch 3 bằng H₂SO₄ 0,1 N cho tới khi dung dịch 3 đang từ màu đỏ chuyển sang màu vàng hổ phách bền vững (lắc đều trong khoảng 15 giây vẫn giữ nguyên màu vàng)

Bước 2 là thử nghiệm: Nghiền đậu tương rang thành bột có kích cỡ 0,1 mm, trộn đều bột và rải đều thành một lớp mỏng trên giấy lọc, nhỏ từng giọt dung dịch 4 cho tới khi mẫu trên giấy lọc được ướt đều, sau 5 phút kiểm tra màu đỏ trên mẫu. Không thấy màu đỏ thì đậu tương đã chín hoàn toàn, có rải rác vài chấm đỏ thì đậu tương còn sống khoảng 3% - 5%, thấy màu đỏ trên toàn bộ mặt mẫu thì đậu tương còn sống khoảng trên 25%.

* Phương pháp xác định độ hòa tan của protein trong đậu tương sau xử lý

Phương pháp xác định hoạt lực của enzym ureaza là để xác định xem đậu tương đã chín đủ độ hay chưa, còn phương pháp này nhằm xác định đậu tương đã bị chín quá hay

chưa. Nếu xử lý nhiệt chín quá thì protein trong đậu tương sẽ bị biến tính và độ hòa tan của nó trong KOH sẽ bị giảm.

Cách thử như sau: Nghiền đậu tương (sau xử lý nhiệt) thành bột có kích cỡ 0,25 mm, cân chính xác 1,5 g bột cho vào bình tam giác 250 ml, dùng pipet chuẩn độ cho 75 ml dung dịch KOH 2% vào bình tam giác chứa mẫu, khuấy đều bằng máy khuấy từ tính, ly tâm với tốc độ 2700 vòng/ phút trong 15 phút, lấy 15 ml dung dịch ở phía trên (không đưa pipet xuống đáy bình tam giác), phân tích hàm lượng protein hòa tan bằng phương pháp kjeldahl, tính tỷ lệ phần trăm protein hòa tan so với protein thô của mẫu đậu tương (phân tích protein của mẫu đồ tương trước khi thử nghiệm). Kết quả về tỷ lệ protein hòa tan được so sánh với tiêu chuẩn của Hiệp hội đậu tương Hoa Kỳ, 1993 (ASA standard). Cụ thể là độ hòa tan protein từ 94 - 100% là đậu sống, từ trên 85% đến dưới 94% là đậu chưa chín, từ 75% đến 85% là đậu chín đủ độ, dưới 75% là đậu chín quá kỹ.

Các thông tin trên được tham khảo từ: Close và Memke, 1986, Arba và Dale, 1993, Figiang Xiong, 1998, Micronizer Soya test, 1998, Yiqiang Xiong, 1999.

5.1.4. Ảnh hưởng của chất kháng dinh dưỡng và đậu tương được chế biến bằng các phương pháp khác nhau đến vật nuôi

Theo tài liệu của Hiệp hội đậu tương Hoa Kỳ (Tài liệu hội thảo, 1999); Aumaitre (1976); Francesh và cs (1990); Friesen và cs (1992); Hancock và cs (1990); Healy và cs (1994); Huisman và cs (1992); Kim và cs (1995); Lorwrence và cs (1988); Liener (1976); Mahan (1966); Maxwell và cs (1970); Randy và cs (1982); Tait và cs (1988); Wigan và cs (1994); Wondra và cs (1995); Đào Văn Huyền (1995) thì các chất kháng dinh dưỡng trong đậu tương và các phương pháp chế biến đậu tương có ảnh hưởng đến vật nuôi như sau:

*** Ảnh hưởng của chất kháng dinh dưỡng đến vật nuôi**

Các nhà khoa học đã làm thí nghiệm cho gà thịt được ăn thức ăn có đậu tương với các mức alkaloid khác nhau và thấy rằng tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn tỷ lệ nghịch với hàm lượng alkaloid trong đậu tương. Hàm lượng alkaloid càng tăng thì tỷ lệ tiêu hóa càng giảm, ở tỷ lệ alkaloid 3,92% thì tỷ lệ tiêu hóa thức ăn giảm 10%, còn tỷ lệ 12% thì giảm 22%. Các nhà khoa học đề xuất tỷ lệ alkaloid tối đa là 1,1%, dưới mức này thì không ảnh hưởng tới tỷ lệ tiêu hóa và sinh trưởng của gia cầm.

Nghiên cứu về hợp chất Oligosaccharid, các nhà khoa học đã kết luận chất này không bị phân hủy bởi men tiêu hóa và nó dễ bị lên men sinh khí gây rối loạn tiêu hóa. Sự miễn cảm với oligosaccharid ở lợn nhiều hơn so với gia cầm. Tuy nhiên, nó thường có hàm lượng thấp trong đậu tương nên ít gây ảnh hưởng đến tiêu hóa, hấp thu, sinh trưởng của vật nuôi.

Các nhà khoa học đã nghiên cứu về chất kháng enzym trypsin và kết luận động vật dạ dày đơn chịu tác động của anti trypsin rất khác nhau. Tuy nhiên có cùng điểm chung là nó làm tăng tiết enzym trypsin dẫn đến tuyến tụy làm việc quá mức và phải tăng sinh, hậu quả của việc tăng sản sinh enzym trypsin là phải tăng huy động các axit amin chứa lưu huỳnh cho việc tăng sản xuất enzym này dẫn đến cơ thể thiếu axit amin chứa lưu huỳnh từ đó làm cho giảm sinh trưởng của vật nuôi.

* Ảnh hưởng của đậu tương được chế biến bằng các phương pháp khác nhau đến vật nuôi.

Có nhiều phương pháp chế biến đậu tương nhưng thông dụng nhất và áp dụng với quy mô lớn công nghiệp là nghiền (búa hoặc trục lăn), rang chín sau đó nghiền, hấp chín sau đó nghiền, ép đùn (vừa xử lý nhiệt vừa ép thành bột).

Thí nghiệm về sử dụng thức ăn hạt được nghiền bằng búa nghiền và bằng trục lăn cho thấy: tỷ lệ tiêu hóa của vật chất khô, năng lượng và protein của khẩu phần thức ăn được nghiền bằng trục lăn cao hơn so với được nghiền bằng búa nghiền.

Thí nghiệm sử dụng đậu tương được chế biến bằng phương pháp ép đùn so với các phương pháp khác (rang, xử lý vi sóng sau đó nghiền) cho thấy: tỉ lệ tiêu hóa vật chất khô, năng lượng, lipid và protein của phương pháp ép đùn cao hơn so với các phương pháp khác.

Một số nhà nghiên cứu đã cho biết: Nếu sấy đậu tương quá lâu sẽ làm giảm độ dễ tiêu của các axit amin, đặc biệt là lysin, arginin, triptophan. Khi hấp nóng khô đậu tương với áp suất 1 atmosphere trong 4 giờ đã làm giảm độ dễ tiêu của lysin 40%. Nếu sấy lysin cùng với xenluloza thì lysin sẽ bị phá hủy và chuyển thành dạng không đồng hóa được đối với gà con nhưng nếu chỉ sấy riêng lysin tinh khiết thì nó vẫn giữ nguyên giá trị.

Các nhà nghiên cứu cho biết thức ăn hạt được chế biến bằng phương pháp nổ bỏng sau đó nghiền sẽ nâng cao được tỷ lệ tiêu hóa vật chất khô, protein.

Thí nghiệm về ảnh hưởng của kích thước bột sau nghiền đến tỷ lệ tiêu hóa thức ăn, các nhà nghiên cứu cho biết: Kích cỡ hạt nghiền nhỏ đã làm tăng độ pH dạ dày, tăng hoạt tính enzym pepsin dẫn đến tăng tỷ lệ tiêu hóa vật chất khô, năng lượng, protein và tăng tốc độ sinh trưởng của vật nuôi.

Ở trong nước, một số tác giả như Đào Văn Huyền, cũng đã nghiên cứu về phương pháp rang đậu tương thủ công bằng chảo và đã chỉ ra được nhiệt độ rang (115 - 127°C), thời gian rang (3 - 5 phút) sẽ bảo đảm đậu tương chín đủ độ, không bị sống và cũng không bị cháy.

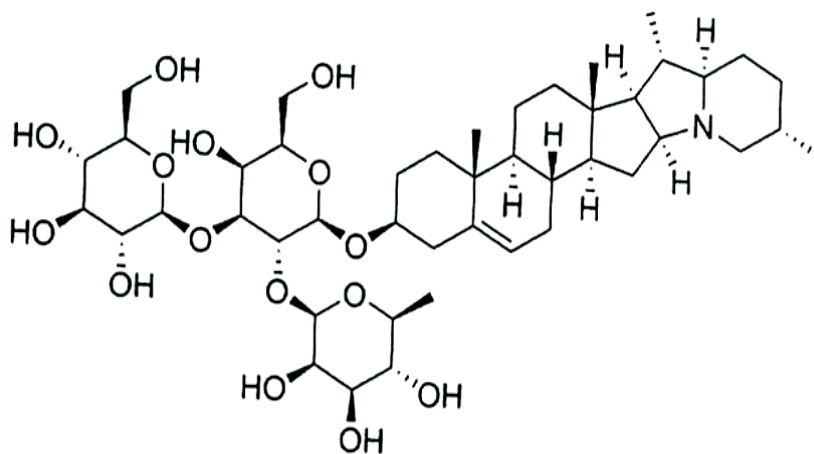
Thí nghiệm về sử dụng khô dầu đậu tương được tách vỏ và không được tách vỏ trước khi ép hoặc chiết xuất dầu cho thấy không có sự khác biệt về khối lượng sống và hiệu suất chuyển hóa thức ăn giữa hai loại khô dầu đậu tương này.

5.2. Độc tố solanin trong khoai tây

5.2.1. Giới thiệu về độc tố solanin

Solanin được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1820 khi phân lập chất gây độc từ cây Bạch anh (*solanum nigrum*). Sau này người ta phát hiện thấy solanin có trong cây của nhiều loài thuộc chi *solanum*, như khoai tây (*solanum tuberosum*), cà chua (*solanum lycopersicum*), cà tím (*solanum melongena*)... Solanin được sinh ra tự nhiên trong các bộ phận của cây (lá, quả, củ...).

Solanin là chất độc thuộc loại glycoalkaloid, có vị đắng, công thức hóa học là $C_{45}H_{73}NO_{15}$, solanin được tạo thành từ alkaloid solanidin và carbohydrat (glyco -) mạch nhánh, có cấu trúc và cấu tạo hóa học như sau:



Hình 5.5. Cấu tạo hóa học của solanin

Củ khoai tây khi tiếp xúc với ánh sáng một thời gian, vỏ củ sẽ chuyển sang màu xanh, khi đó hàm lượng glycoalkaloid sẽ hình thành và tăng lên. Đây là cách phòng vệ của củ khoai nhằm ngăn chặn chuột, sâu bọ xâm hại. Màu xanh của vỏ là chất diệt lục nên không độc hại, nó là màu chỉ thị giúp ta nhận biết hàm lượng solanin và chaconin có mặt trong khoai tây.

Bệnh rụng lá có thể làm tăng hàm lượng glycoalkaloid trong củ khoai tây. Khoai tây bị sứt sứt, tróc vỏ khi thu hoạch và vận chuyển cũng dễ làm tăng hàm lượng glycoalkaloid trong củ. Đây cũng là phản ứng phòng vệ của củ.

Hàm lượng solanin cho phép trong khoai tây thương phẩm là 0,2 mg/kg khoai tươi. Trong củ khoai tây đã thấy vỏ có màu xanh thì hàm lượng solanin sẽ ≥ 1 mg/kg khoai tươi. Nếu người và vật nuôi ăn khoai tây có vỏ màu xanh mà không gọt vỏ thì có thể nguy hiểm đến tính mạng.

Khi khoai tây mọc mầm, mầm của khoai tây tiếp xúc với tia cực tím sẽ sản sinh ra solanin và chaconin với hàm lượng rất cao. Khoai tây mọc mầm thì hàm lượng solanin

không chỉ cao ở trong mầm, mà cả trong củ và đặc biệt là vỏ khoai, hàm lượng này cao hơn bình thường gấp nhiều lần. Hàm lượng solanin trung bình trong ruột củ khoai tây là 0,04 - 0,07 g/kg chất tươi, trong vỏ là 0,30 - 0,55 g/kg chất tươi, nhưng trong khoai tây mọc mầm thì hàm lượng này ở ruột củ cao hơn gấp tới 20 lần, và trong vỏ củ cao hơn gấp 100 lần.

Cần lưu ý: Trong củ khoai tây để giống có tới 30 - 80% solanin ở củ và lớp vỏ thịt.

5.2.2. Cơ chế gây độc và triệu chứng ngộ độc solanin

Solanin gây độc là do có sự tương tác hóa học giữa nó và màng ty thể; solanin khi tiếp xúc với màng ty thể đã làm thay đổi khả năng trao đổi kali của ty thể, giảm điện thế của màng tế bào dẫn đến Ca^{++} từ ty thể được vận chuyển vào nguyên sinh chất của tế bào, nó làm tăng nồng độ Ca^{++} trong tế bào chất và làm tổn thương tế bào.

Liều lượng solanin gây ra triệu chứng ngộ độc ở người là 2 - 5 mg/kg thể trọng, liều lượng gây tử vong là 3 - 6 mg/kg thể trọng. Thực phẩm có hàm lượng solanin cao thì có thể thấy triệu chứng ngộ độc ngay sau khi ăn 30 phút, còn thông thường là khoảng trên dưới 10 giờ sau khi ăn. Liều lượng 25 mg solanin đối với người lớn có thể gây ra các triệu chứng buồn nôn, đau đầu, chóng mặt, liều lượng 400 mg đối với người lớn có thể gây tử vong.

Ngộ độc solanin thường thấy triệu chứng là rối loạn tiêu hóa và thần kinh. Cụ thể là buồn nôn, nôn mửa, đau bụng, ỉa chảy, họng bị nóng rát, nhịp tim rối loạn, đau đầu, chóng mặt. Nếu ngộ độc nặng thì có thể thấy ảo giác, mất cảm giác hoặc tê liệt, sốt, da vàng, đồng tử giãn và thân nhiệt giảm.

Chẩn đoán ngộ độc solanin thường là khó khăn vì dễ nhầm với viêm dạ dày, ruột và các ngộ độc khác. Vì vậy phải hỏi gia chủ về thức ăn của vật nuôi, nếu thức ăn có khoai tây thì mới xem xét theo hướng ngộ độc solanin.

Ngộ độc solanin với hàm lượng không cao và không kéo dài thì gia súc sẽ tự hồi phục. Các gia súc thể trạng yếu, suy dinh dưỡng, gia súc có thai, nuôi con, gia súc non thì mắc cảm hơn với solanin và khả năng hồi phục chậm hơn.

Sử dụng khoai tây làm thức ăn chăn nuôi không phải là phổ biến. Tuy nhiên, ở các vùng trồng khoai tây người ta thường tận dụng những củ khoai tây bị sứt mẻ, trầy xước khi thu hoạch, thậm chí khoai tây đã mọc mầm làm thức ăn chăn nuôi. Điều này rất nguy hiểm, bởi vì đun sôi (nấu, luộc) hầu như không có tác dụng phân hủy solanin; sấy khô giảm thiểu rất ít; chỉ có rán trong mỡ ở nhiệt độ 170°C thì có tác dụng giảm thiểu solanin tốt hơn cả. Vì thế người ta khuyến cáo cần gọt kỹ vỏ khi vỏ củ khoai tây có màu xanh và không sử dụng khoai tây mọc mầm làm thức ăn cho gia súc.

5.3. Tác động độc của khoáng

Nguyên liệu cấu thành thức ăn hỗn hợp của vật nuôi thường thiếu hoặc không cân đối các khoáng đa lượng và vi lượng. Vì vậy, người ta thường bổ sung khoáng cho vật nuôi dưới dạng premix khoáng đưa vào thức ăn hỗn hợp hoặc tảng đá liếm và các dạng khác. Bổ sung khoáng đủ nhu cầu của vật nuôi thì có tác động tốt như tăng sức khỏe, tăng sinh trưởng, nâng cao hiệu suất chuyển hóa thức ăn... nhưng khi thừa khoáng so với nhu cầu của vật nuôi thì sẽ có tác động ngược lại. Do đó nắm được nhu cầu khoáng của vật nuôi và tác động độc của khoáng là hết sức cần thiết đối với cán bộ khoa học kỹ thuật ngành chăn nuôi. Dưới đây là một số khoáng cần được lưu ý về tính gây độc khi hàm lượng của chúng trong thức ăn vượt quá nhu cầu của vật nuôi.

Phốt pho (P)

Nhu cầu của động vật

Động vật non, gia súc cái chữa kỳ 2 và nuôi non cần thiết nhiều P. Trong điều kiện bình thường nhu cầu P của động vật như sau (g/kg VCK thức ăn): Bò lớn, cừu 2-3; bò, cừu chữa và cho sữa 3-4,5; bò choai, cừu tơ 5-3; lợn nái 3,5-5; lợn con dưới 2 tháng tuổi 7-5,5; trên 2 tháng tuổi 5-4,5; gà mái, gà thịt 6,5-8.

Tác dụng độc của phốt pho

Thừa P dẫn tới sử dụng Ca, Mn giảm làm cho gia súc bị yếu xương, gia súc non còi xương. Bệnh này hay gặp ở động vật đực (đặc biệt là bò đực), gây tích lũy P ở mô mềm, tỷ lệ chết cao. Thừa Ca, P gây sỏi thận, bàng quang, thừa P gia súc giảm sử dụng thức ăn. Khi tăng Mg trong thức ăn có ảnh hưởng xấu đến hấp thu, sử dụng P.

Magiê (Mg)

Nhu cầu Mg

Động vật dạ dày đơn, gia cầm yêu cầu 0,4-0,6g/kg VCK thức ăn, gia súc non nhai lại yêu cầu 1-2g/kg VCK thức ăn.

Tác dụng độc của magiê

Thừa Mg ít khi gặp. Liều 4-5g/kg VCK thức ăn chưa gây nguy hiểm, nhưng cao hơn 7g/kg VCK sẽ gây rối loạn tiêu hóa, giảm tăng trọng, tăng thải canxi theo nước tiểu, gây sỏi thận, bàng quang.

Sắt (Fe)

Nhu cầu Fe

Trong thức ăn có từ 80-120 mg Fe/kg vật chất khô là đáp ứng nhu cầu của gia súc. Riêng lợn chữa, lợn con cần có 120-150 mg/kg vật chất khô. Khi thức ăn có khô dầu

bông cần tăng hàm lượng sắt trong thức ăn. Vì sắt giúp trung hòa và phân giải chất độc gossipol.

Tác động độc của Sắt (Fe)

Thừa sắt sẽ gây rối loạn tiêu hóa, hấp thu thức ăn, gây ỉa chảy và làm giảm khả năng sản xuất của vật nuôi.

Thừa sắt sẽ gây ảnh hưởng đến hấp thu một số khoáng khác, mà trước tiên là kẽm và đồng.

Thừa sắt sẽ dẫn đến sắt tự do trong mô bào tăng do transferrin và lactoferrin trong máu bị quá tải không thể kết hợp hết với sắt. Sắt tự do (Fe^{2+}) sẽ có phản ứng với các chất khác ở mô bào tạo ra ôxy và ôxy sẽ ôxy hóa lipit (peroxid hóa lipit) làm sản sinh các gốc tự do, vì vậy cơ thể phải tăng cường sản xuất và sử dụng chất chống ôxy hóa dẫn đến sự mất cân bằng sinh hóa học trong cơ thể.

Thừa sắt gây ngộ độc chỉ khi hàm lượng tới ngưỡng sau (mg/kg vật chất khô khẩu phần): 2000-2400 đối với động vật nhai lại, 4.000-5.000 đối với lợn, trên 1.600 đối với gia cầm.

Đồng (Cu)

Yêu cầu của động vật đối với đồng

Hàm lượng đồng (mg/kg VCK thức ăn) thỏa mãn nhu cầu của các loại động vật như sau: 10-12mg đối với bò thịt, 8-10mg đối với cừu, 10-15mg đối với lợn và 7-10mg đối với gia cầm. Khi thức ăn nhiều molipden và ion sunfat cần tăng hàm lượng đồng lên 3-4 lần hoặc hơn nữa.

Tác động độc của đồng (Cu)

Khi khẩu phần ăn dư thừa đồng với liều lượng lớn có thể gây độc cho vật nuôi, đặc biệt là cừu. Do đó, người ta khuyến cáo không nên bổ sung đồng vào thức ăn cho cừu.

Gia súc bị ngộ độc đồng sẽ giảm tính thèm ăn, gan hoại tử và có màu vàng do đồng dư thừa được tích lũy chủ yếu ở gan, ngộ độc nặng có thể gây tử vong.

Khi hàm lượng đồng trong thức ăn có từ 30-50mg/kg VCK đối với bò thịt và 100-250mg/kg VCK đối với lợn, gia cầm thì sẽ gây ngộ độc.

Selen (Se)

Nhu cầu selen

Nhu cầu Se của động vật được áp ứng khi đủ vitamin E là 0,1mg và khi thiếu vitamin E là 0,3mg/kg VCK thức ăn. Khi hàm lượng Se dưới 0,1mg/kg VCK thì cần bổ sung thêm Se vào thức ăn.

Tác động của selen (Se)

Selen là một chất độc hại, nhưng người ta đã phát hiện thấy một số vai trò sinh hóa học rất quan trọng của selen trong cơ thể động vật. Cần phải rất thận trọng về liều lượng bổ sung selen vào thức ăn cho vật nuôi, ngưỡng an toàn là dưới 0,3ppm/1kg VCK thức ăn.

Khi gia súc ăn thức ăn có liều lượng selen quá cao có thể bị ngộ độc cấp tính, biểu hiện là viêm ruột, phổi bị xuất huyết và tích dịch, gan, thận sưng, hoại tử, mất khả năng hoạt động; các nguyên nhân trên là lý do dẫn đến tử vong. Khi gia súc ăn thức ăn có chứa selen cao hơn mức bình thường, hoặc chăn thả trên đồng cỏ đất kiềm (giàu Se) có thể dẫn tới gia súc bị nhiễm độc selen mãn tính, biểu hiện là con vật đi lại khó khăn do móng biến dạng, lông bị rụng, thể trạng gầy yếu, sức sản xuất giảm.

Thừa Se gia súc giảm tính thèm ăn, giảm trọng lượng, ảnh hưởng xấu đến trao đổi protein, hoạt động của tim và gan không bình thường. Bê, cừu, lợn bị bệnh khi thức ăn chứa 10-15mg/kg VCK, gia cầm bị bệnh khi có 3-4mg/kg VCK. Liều gây chết cho bò là 10-11 mg/kg, ngựa 3-4; lợn 13-18mg/kg khối lượng cơ thể.

Molipden (Mo)

Tác động của molipden (Mo)

Ngộ độc molipden xảy ra khi khẩu phần có chứa hàm lượng Mo vượt quá 2,5mg/kg VCK hoặc trong đất có chứa hàm lượng Mo trên 300ppm.

Liều lượng Mo cao sẽ ảnh hưởng đến tiêu hóa, hấp thu thức ăn (gia súc bị ỉa chảy) ảnh hưởng đến quá trình tạo máu (gây thiếu máu) dẫn đến gia súc bị gầy yếu và giảm sức sản xuất.

5.4. Một số chất gây độc khác

Một số chất có trong thức ăn vật nuôi có thể gây độc trực tiếp nhưng có thể chỉ là nguyên liệu tạo nên chất gây độc ở trong đường tiêu hóa của vật nuôi. Một số chất là thức ăn hoặc thức ăn bổ sung của khẩu phần nhưng khi nó chiếm một tỷ lệ bất hợp lý hoặc bổ sung sai phương pháp thì cũng dẫn tới gây độc.

Gossipol - glucozid trong khô dầu bông

Khô dầu bông có tỉ lệ protein thô khá cao, từ 35-38% trong khô dầu; đây là một trong các nguồn thức ăn giàu protein cho vật nuôi. Tuy nhiên, trong khô dầu bông có chứa chất độc gossipol-glycozid gây độc hại đối với vật nuôi. Chất này chiếm tới 0,2% trong khô dầu bông ép còn trong khô dầu bông chiết ly thì có dưới 0,04%.

Ngoài gossipol, khô dầu bông còn chứa axit béo mạch vòng, nó cũng gây tác động xấu đến vật nuôi.

Gossipol khi liên kết với các axit amin tự do làm giảm giá trị sinh học của protein, còn axit béo mạch vòng thì phá hủy trao đổi mỡ bình thường trong cơ thể động vật, gây sản sinh ra nhiều axit béo stearic. Khi tỉ lệ khô dầu bông trong khẩu phần cao sẽ làm cho mỡ động vật trở nên rắn hơn, điểm nóng chảy cao hơn và làm ảnh hưởng đến chất lượng mỡ thân, mỡ sữa, đối với gà đẻ thì nó làm cho màu sắc, mùi vị của lòng đỏ và lòng trắng trứng không bình thường.

Có thể khử độc gossipol bằng cách bổ sung FeSO_4 với tỉ lệ 1:1 để tạo thành dạng liên kết Fe-gossipol không hấp thu trong đường tiêu hóa và được thải trừ theo phân.

Nitrat trong thức ăn

Một số cây, cỏ sorghum có chứa hàm lượng nitrat (NO_3) cao. Khi bón đạm cho cây, cỏ với hàm lượng cao làm cho quá trình chuyển hóa đạm không triệt để, nitrat là sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hóa không triệt để đó. Vì thế, hàm lượng nitrat trong cây, cỏ tỷ lệ thuận với mức bón đạm.

Có nhiều kết quả nghiên cứu khác nhau về liều lượng gây độc của nitrat trong thức ăn của gia súc nhai lại; tổng hợp chung lại là với liều lượng 0,5g/kg vật chất khô trở lên có thể gây ngộ độc và trên 2g/kg VCK có thể gây chết.

Cơ chế gây độc của nitrat là trong dạ cỏ nitrat(NO_3^-) dưới tác động của vi sinh vật dạ cỏ sẽ chuyển thành nitrit. Nitrit đã tác động đến Fe^{3+} trong hemoglobin và chuyển thành Fe^{2+} dẫn tới máu mất chức năng vận chuyển oxy và gây thiếu oxy ở mô bào.

Gia súc bị ngộ độc nitrat thường có biểu hiện thờ gáp do thiếu oxy, tăng nhịp tim, mạch, rối loạn tiêu hóa và tiết niệu, ngộ độc nặng có thể chết sau vài giờ sau khi thấy các triệu chứng trên. Khó có thể chẩn đoán đúng ngộ độc nitrat nếu không tìm hiểu về thức ăn đã sử dụng cho gia súc. Điều trị ngộ độc theo hướng dẫn của bác sỹ thú y.

Urê

Đạm urê thường được bổ sung vào thức ăn tinh của gia súc nhai lại với một tỷ lệ thích hợp để thay thế một phần nitơ của thức ăn (bột cá, đậu tương...) nhằm giảm chi phí thức ăn nhưng vẫn bảo đảm năng suất và chất lượng sản phẩm.

Tuy nhiên, khi bổ sung vượt quá liều lượng cho phép hoặc không đúng phương pháp sẽ gây ngộ độc urê đối với gia súc nhai lại. Liều lượng urê gây độc phụ thuộc vào nhiều yếu tố như:

Thức ăn giàu hay nghèo hydratcacbon, liều lượng urê gây độc ở khẩu phần nghèo hydratcacbon thấp hơn nhiều so với khẩu phần giàu hydratcacbon.

Động vật được ăn thức ăn có bổ sung urê thường xuyên hay lần đầu tiên được ăn thức ăn này. Liều lượng urê gây ngộ độc cho động vật được ăn lần đầu tiên thì chưa chắc đã gây ngộ độc cho động vật đã được ăn quen, thậm chí với liều lượng cao hơn gấp 5 - 6 lần.

Động vật có thể trạng yếu mẫn cảm urê hơn so với động vật khỏe mạnh. Vì vậy liều lượng urê gây ngộ độc đối với động vật có thể trạng yếu thấp hơn so với động vật thể trạng khỏe.

Bổ sung urê vào thức ăn ở dạng lỏng hoặc phun dung dịch urê vào thức ăn thì dễ gây ngộ độc hơn so với trộn urê vào thức ăn khô.

Động vật bị trúng độc urê thường thấy triệu chứng thở gấp, nước bọt trào ra miệng, trướng hơi, toàn thân run rẩy, nhiễm độc nặng thì bị co giật và chết. Trái với bột thực thức ăn giàu bột đường, ngộ độc urê làm cho pH dạ cỏ tăng và gây dừng nhu động dạ cỏ, hàm lượng amonia trong máu cũng tăng cao (ngộ độc mãn tính) và rất cao (ngộ độc cấp tính) nếu tăng đến 5mg% thì có thể gây tử vong.

Khó có thể chẩn đoán được gia súc bị ngộ độc urê nếu như không hỏi về thức ăn đã sử dụng nuôi gia súc. Khi biết gia súc bị ngộ độc urê thì điều trị theo hướng dẫn của bác sỹ thú y.

Liều lượng urê bổ sung vào thức ăn tính an toàn là dưới 1% tính theo khối lượng thức ăn khô không khí, còn nếu tính theo thể trọng gia súc thì dưới 10g cho 100kg thể trọng một ngày đêm. Cần phải tập cho gia súc làm quen với thức ăn có chứa urê với liều lượng thấp, sau đó mới tăng cao dần đến mức tối đa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu Tiếng Việt

1. Bùi Văn Chính (1995), “Nghiên cứu chế biến và sử dụng phụ phẩm nông nghiệp và nguồn thức ăn sẵn có ở nông thôn”, *Tuyển tập nghiên cứu khoa học* (69 - 95). Nxb Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 39 - 43.
2. Claude Moreau, Đặng Hồng Miên (dịch) (1980), *Nấm mốc độc trong thực phẩm (Moississures Toxiques Dans L'Alimentation)*, Nxb Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. Ngô Tiến Dũng, Đinh Văn Bình, Nguyễn Thị Mùi, Inger Ledin (2004), “Ảnh hưởng trồng xen cây đậu *Flemingia Macrophylla* đến năng suất của cây sắn và sử dụng ngọn lá sắn khô thay thế cám hỗn hợp trong khẩu phần cho dê sinh trưởng”, *Báo cáo khoa học năm 2008, Phân dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi*, Hà Nội, 7-8/10/ 2009, tr. 96 - 104.
4. Figiang Xiong (1988), “Khô đậu tương tách vỏ và giá trị của nó trong công thức pha trộn thức ăn chăn nuôi”. Hội thảo công nghệ thức ăn chăn nuôi, Hiệp hội đậu tương Hoa Kỳ, 1999.
5. Grigover N. G., (1981), Phí Văn Ba (dịch), *Dinh dưỡng axit amin của gia cầm*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
6. Đậu Ngọc Hào, Lê Thị Ngọc Diệp (2003), *Nấm mốc và độc tố aflatoxin*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Từ Quang Hiển, Phạm Sỹ Tiệp (2005), “Nghiên cứu thành phần hóa học, độc tố của củ, lá sắn và sử dụng sắn trong chăn nuôi lợn thịt F₁ (ĐB x MC)”, *Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học về chăn nuôi* (tập I), Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 122 - 143.
8. Từ Quang Hiển, Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Inh (2008). *Nghiên cứu sử dụng keo giậu (Leucaena) trong chăn nuôi*, Nxb Đại học Thái Nguyên.
9. Trần Thị Hoan, Từ Quang Hiển, Từ Trung Kiên (2011), “Ảnh hưởng của các phương pháp chế biến đến thời gian phơi, sấy và thành phần hóa học của bột lá sắn”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, số tháng 9 năm 2011, tr. 34.
10. Trần Thị Hoan (2011), “Nghiên cứu ảnh hưởng của các phương thức trồng sắn, các mức phân đạm, các phương pháp chế biến lá sắn khác nhau đến năng suất và thành phần hóa học của lá sắn tại trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên”, *Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ năm 2009*.
11. Đào Văn Huyền (1995). *Chế biến thức ăn hỗn hợp cho gia súc, gia cầm*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
12. Nguyễn Khắc Khôi (1982), *Sử dụng sắn trong chăn nuôi lợn*, *Tạp chí KHKT Viện chăn nuôi* tháng 4/ 1982, tr. 53 - 55.
13. Dương Thanh Liêm, Ngô Văn Mận, Bùi Xuân An, Nguyễn Phúc Lộc, Nguyễn Văn An (1985), *Kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật (1981-1985)*, trường Đại học Nông nghiệp 4, tr. 8 - 15.
14. Bùi Đức Lũng, Lê Hồng Mận (1995). *Nuôi gà Broiler năng suất cao*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
15. Đinh Văn Lữ (1972). *Sản xuất và chế biến sắn*. NXB Nông thôn, Hà Nội.

16. Nguyễn Thị Hoa Lý, Nguyễn Thị Lộc, Lê Văn An, Hồ Trung Thông, (1999). “*Một số kết quả nghiên cứu về chế biến và sử dụng sắn trong chăn nuôi lợn ở Thừa Thiên Huế*”. Kết quả nghiên cứu và khuyến nông sắn Việt Nam, Thông tin về Hội thảo sắn Việt Nam, tổ chức tại Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Miền Nam, ngày 2 - 4/ 3/ 1998, tr. 97 - 105.
17. Nguyễn Nghi, Phạm Văn Lợi, Bùi Thị Gợi, Bùi Thị Oanh, “Kết quả nghiên cứu xác định giá trị dinh dưỡng một số giống sắn trồng ở Việt Nam và sử dụng bột củ, lá sắn làm thức ăn cho lợn và gà nuôi thịt”, *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, số 1/1984, tr. 80 - 93.
18. Silvestre và M. Araudeau (1990) (Vũ Công Hậu và Trịnh Tường Mai dịch), *Cây sắn*, Nxb Nông nghiệp Hà Nội, tr. 9 - 25; 94 - 104; 170 - 236.
19. Nguyễn Văn Thường (1993). *Sổ tay thành phần dinh dưỡng thức ăn gia súc Việt Nam*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
20. Phạm Sỹ Tiếp (1999), “*Nghiên cứu giá trị dinh dưỡng của một số giống sắn ở trung du và miền núi phía Bắc, ảnh hưởng của phương pháp chế biến đến thành phần hóa học của củ, lá và khả năng sử dụng bột lá sắn để vỗ béo lợn F₁ (ĐB x MC)*”, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Chăn nuôi Quốc gia, Hà Nội.
21. Phùng Quang Trường, Đặng Thị Dương, Khuất Thị Thu Hà, Trần Thị Loan (2008), “*Nghiên cứu chế biến thân cây sắn sau thu hoạch củ làm thức ăn cho bò sữa trong mùa đông*”, Báo cáo khoa học năm 2008, Phần dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi, Hà Nội, 7 - 8/10/ 2009, tr. 395 - 400.
22. Trần Quốc Việt (1998), Các phương pháp chế biến thức ăn hạt và ảnh hưởng của các phương pháp chế biến đến tính ngon miệng, tỷ lệ tiêu hóa vật chất khô (khả năng tiêu hóa hấp thu các chất dinh dưỡng) và hiệu quả sử dụng thức ăn của gia súc gia cầm (Tài liệu tổng hợp).
23. Yiqiang Xiong (1999), *Quản lý nguyên liệu làm thức ăn*, ASA Trung Quốc 8/1999.

II. Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Allen D. Leman, Barbara E. Straw, William L. Mengeling, Sylvie D’; Allaire and David J. Taylor (1992), “*Diseases of swine*”, 7th edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA.
2. Aumaitre A. (1976). Effect of flaking and popping of barley and maize on the performances of piglets weaned at 21 days; influence on digestibility of the dietary constituents. *Animal zoo technology* 25, pp. 41 - 51.
3. Barry L Nestel. (1974), *Current Trends in Cassava Research Agriculture*, Food and nutrition sciences division International development research center, Archiv Nestel no. 12, pp. 12 - 16.
4. Batan El (1986), “*Aflatoxin in Maize*”, A proceedings of the Workshop, Mexico, April 7 - 11.
5. Calnek B.W, Jahn Barnes H., Beard C.W., Reid W.M., Yoder H.W., Iowa J.R. (1992), *Diseases of Poultry*, State University Press, Ames, Iowa. USA.
6. Close W and Memke K.H. in co - operation with H, Steingass and A. Trooscher (1986), *Manual topics in Animal nutrition*, pp. 39 - 40.
7. Duong Thanh Liem, Nguyen Phuc Loc, Nguyen Van Hoa, Ngo Van Man, Bui Huy Nhu Phuc and Bui Xuan An, (1998). *The use of cassava dried leaf powder as animal feed*. In: Hoang Kim and Nguyen Dang Mai (Eds). *Progress in cassava Research and Extension in*

- Vietnam. Proc. 7th Vietnamese Cassava Whorshop, held at IAS, Ho Chi Minh city, Vietnam. Match 4 - 6, 1997, pp 256 - 265.
8. Francesh M., Perez V, Esteve A, and Brufau E (1990). Use of white lupin (*L. albus*) and the blue lupin (*L. angustifolius*) with intermediate or high alkaloid content in feeding broiler chickens. *Investigation Agraria, production of Sanidal animales* - 5, pp. 91 - 107.
 9. Friesen K.J., Nelssen J.L., Behnke K.C., Goodban R.D., and Kats L.G. (1992). *The effect of moist and dry extrusion processing on growth performance and nitrogen digestibility in the early - weaned pigs*. Swine Day. 1992. Kansas State University, pp. 61 - 64.
 10. Fuller M.F (1987). Pig Feeding in Asia and the Pacific FAO, Roma, pp.69- 70.
 11. Gil J.L., Escobar G., and Buitrago J.A. (2001), Evaluación técnica y enconómica de cuatro dietas basada en harina de yuca y una dieta comercial para la alimentación de pollos de engorde. (Technical and economic evaluation of four diets based on cassava flour and a commercial diet for feeding broilers) Technical Report. CLAYUCA, pp 14.
 12. Goll B. (1981), Tropical feeds. "*FAO Animal production and Health series*" - Rome.
 13. Gomez G. (1979), "*Cassava as swine feeds wold animal review*", 29/ 1979, pp. 13 - 20.
 14. Gomez G. and Valdivieso M. (1983). Cassava meal for baby pig feeding Nutrition - Reports - International, 28: 3, pp. 547 - 558, 16 ref
 15. Gomez G., Valdivieso M., Santos J., and Noyos C. (1983). Evalution of cassava root meal prepared from low - or high - cyanide containing cultivars in pigs and broiler diets. Nutrition - report International. 28: 4, pp. 693 - 704, 26 ref.
 16. Gomez G., Santos J., Valdivieso M. (1984). Eluvation of Methionine supplementation to diets containing cassava meal for swine. *Journal of Animal science*, 58: 4, pp. 812 - 820, 17 ref.
 17. Gomez G.G. (1991), *Use of cassava products in pig feeding*. Pignews and Information, 12: 3, pp. 387 - 390, 13 ref.
 18. Gutiérrez C.L., and Martínez R. (1997). Efecto de utilizar harina de yuca u soya intergral en dietas par ponedoras (Effect of using cassava flour and intrgral soybean in diets for layers). Animal Science Faculty. National University of Colombia, Palmira, Valle. Thesis for degree in Animal Science.
 19. Hancock J.D., Lewis A.J., Jones D.B., Giesemann M.A., and Healy B.J. (1990). *Processing method affects the nutritional value of low - inhibitor soybeans for nursery pigs*. Swine Day. 1992. Kansas State University, pp. 52 - 55.
 20. Hamid K and Jaladudin. (1972). Malay. Agric. Res. 1: 48
 21. Healy B.J., Hancock J.D., Kenedy G.A., Bramel - Cox P.J., Behnke K.C., and Hines R.H. (1994). Optimum practical size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 72, pp. 2227.
 22. Holleman L.W.J. (1989). *Java tapioca, its manufacture Grading and use*, D. S. R publication oct. 22.
 23. Huisman J. & Tolman G.H. (1992). *Antinutritional in the plant proteins of diets for non - ruminants*. Recent Advances in animal Nutrition. pp. 3 - 31. (P.C. Garnsworthy, W. Haresign and D.J.A. Cole, editors). University of Nottingham school of Agriculture).
 24. Iheukwumere F.C., Ndubuisi E.C., Mazi E.A and Onyekwere M.U. (2007). Growth, Blood chemistry and carcass yield of Broilers Fed Cassava Leaf Meal (*Manihot Esculenta* Crantz). *International Journal of poultry Science* 6 (8), pp. 555 - 559.

25. Iheukwumere F.C., Ndubuisi E.C., Mazi E.A and Onyekwere M.U. (2008). Performance, nutrient Utilization and Organ Characteristics of Broilers Fed Cassava Leaf Meal (Manihot Esculentab Crantz). *Pakistan journal of Nutrition* 7 (1): pp. 13 - 16.
26. Julián buitrago, Bernardo Ospina, Jorge luis Gil and hernando Aparicia, (2002), *Cassava root and leaf meals as the main ingredients in poultry feeding*: Some experience in Colombia, Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Ancient Crop. Proceedings of the Seventh Regional Workshop held in Bangkok, Thailand. Oct 28 - Nov 1. 2002. The Nippon Foundation, pp. 523 - 541.
27. Khajarearn S and Khajarearn J. (1986). *Utilization of cassava for animal feed*. In: Proc. 24th Kasetsart University Conference, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp 64 - 72.
28. Kim I.H., Hancock J.D., Cabrera M.R., Hines R.H., Rantamen M.M., and Behnke K.C. (1995). *Particle size (1,000 vs. 500 um) affects nutritional value of simple and complex diets for weaning pigs and broiler chicken*. Swine Day. 1992. Kansas State University. 84 - 88.
29. Labadan M.M (1969), "Effects of various treatment and additives on the feeding value of Ipil - ipil leaf meal in poultry". *Philipp Agric.* 53, pp. 392 - 401.
30. Lawrence T.L.J. (1988). *Processing and preparation of cereals for pig diets*. Recent Developments in pig Nutrition Cole, D.J.A. and Haresign W. 1988. Butterworths pp. 230 - 245.
31. Le Duc Ngoan and Nguyen Thi Hoa Ly, (2002). *The use of cassava roots and leaves for feeding pigs in Vietnam*. In: R.H. Howeler (Ed). Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Ancient Crop. Proc. 7th Regional Workshop, held in Bangkok, Thailand. Oct 28 - Nov 1, 2002.
32. Lee Bryant P.K and Yang, Y.F. (1982), "Leucaena seed as a feed ingredient for broiler chicks". *Leucaena Research Reports*. 3: 66.
33. Liener I.D. (1976), Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *Journal of Food Science*. 41, pp. 1076.
34. Lin J.Y and Ling K.H. (1962), "Studies on the mechanism of toxicity of mimosine". *J. Formos Med. Assoc.* 61, pp. 997.
35. Lin K.C., Lin J.H and Tung T.C. (1964), "Effect of amino acids on the growth inhibition of rats caused by mimosine". *J. Formos Med. Asssoc.*, 63, pp. 278 - 284.
36. Lin J.K., Ling T.A and Tung T.C. (1965), "Biochemical study of mimosine. II. Comparative study on the interaction of mimosine and other amino acids with pyridoxal 5 - phosphate in vitro". *J. Formos Med. Asssoc.*, 64, pp. 265 - 272.
37. Lin J.K and Tung T.C. (1966), "Biochemical study of mimosine. III. Comparative study on the activities of metal containing enzymes in B6 - deficient and mimosa fed rats". *Tai - wan I Hsueh - Hui Twa. Chin.* 65 pp. 119 - 124.
38. Lisa L. Ray and Uloyd B. Bullerman. (1982), Preventing Growth of potentially Toxic Molds using antifungal Agents. *Journal food protection*, Vol 45, No10, pp. 953 - 962.
39. Liu Jian Ping and Zhuang Zhong Tang, (2000), *The use of dry cassava roots and silage from leaves for pig feeding in yunnan province of China*, Cassava's potential in Asia in the 21st Century: Present situation and future research and development needs, proceedings of the sixth Regional Workshop held in Ho Chi Minh city, Vietnam. Fed 21 - 25, 2000, the Nippon Foundation, pp. 527 - 537.

40. Lopez P.L., Sayaboc V.S and Deanon A.S. (1979), "The effect of ferrous sulfate on high Ipil - ipil *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit leaf meal fed layers". *Philipp. Agric.* 62, pp. 116 - 129.
41. Lowry J.B. (1981), "Leucaena research at BPT". *Leucaena Research Reports*. 2 pp. 31 - 32.
42. Lowry J.B. (1983), "Detoxification of *Leucaena* by enzymic or microbial processes". In *Leucaena Research in the Asian - Pacific Region*. Ottawa: IDRC. pp. 49 - 54.
43. Lyon C.K. (1985), "Degradation of mimosine during ensiling of *Leucaena*". *J. Sci. Food Agric.* 36, pp. 936 - 940.
44. Mali J.M., Kute L.S., Jambhale N.D. and Kadam S.S. (1990), "Effect of heat processing on anti - nutrients in *Leucaena* seed". *Indian J. Anim. Sci.* 60, pp. 383 - 385.
45. Malynics L.G. (1974), "The effects of adding *Leucaena glauca* (leucocephala) meal to commercial rations for growing pigs". *Papua New Guinea Agric. J.* 25, pp. 12 - 14.
46. Maner J.H and W.G. Pond (1987), *Swine production in temperate and tropical environments*. W. H. Freeman and Co. San Francisco 1987, pp. 245 - 259.
47. Manidool C. (1985), Utilization of tree legumes with crop residues as animal feeds in Thailand. *Relevance of crop residues as animal feeds in developing countries*. IFS, pp. 249.
48. Maxwell C.V., Reimann E.M., Hoekstra W.G., Kowalczyk T., Benevenga R.H. (1970), Effect of dietary practical size on lesion development and on the contents of various regions of the swine stomach. *Journal of Animal Science*. 30, pp. 911 - 922.
49. McDonald P. (1988), Animal nutrition. *Fourth Edition New York*.
50. McMillan A.M and Dudley F.G. (1941). Potato meal, tapioca meal and town waste in chicken rations. *Harper adams Utility. Poult. J.* 26, pp. 191-194
51. Mehan V. K., McDonald D., Haravn L. J. and Jayanthi S. (1991). The groundnut aflatoxin problem. Review and Literature Database. ICRISAT Patancheru Andhra Pradesh 502324. India.
52. Mehan V.K., Gowda C.L.L. (1997), "Aflatoxin Contamination problems in Groundnut in Asia", *International Craps Research Institute for the semi - Arid Tropics - ICRISAT*, Panchearu 502, 324 Andhra Pradesh, India.
53. Minson D.J. (1990), Forage in Ruminant Nutrition. *FAO, Rome*, pp. 163 - 173.
54. Moat M. (1988), "Performance of broiler chicks fed heat and iron treated *Leucaena* leaf meal (LLM). Proceeding of Papua New Guinea Society of Animal Production, Lae Morobe Province". *Maximising Animal Production in Papua New Guinea*. pp. 34 - 38.
55. Moran J.B., Satoto K.B and Dawson J.E. (1982), The utilization of rice straw fed to zebu cattle and sawmp buffalo as influenced by alkali treatment and *Leucaena* supplementation. *Australian Jornal. Agri. Res*, pp 1 - 12.
56. Morito N., Arisawa M., Nagaes M., Hsu H.Y., and Chen Y.P. (1977), "The nutritive value of dried *Leucaena* leaf meal from Malawi: Studies with young chicks". *Shoyakugaku zasshi*. 31, pp. 172 - 174.
57. Mosca P.J., Dijkwel P.A, and Hamlin J.L. (1992), "The plant amino acid mimosine may inhibit initiation at origins of replication in Chinese hamster cells". *Mol. Cell. Biol.* 12, pp. 4375 - 4383.

58. Muller Z., Chou K.C., and Choo B.S. (1971). *Rep. nutrition (poultry)* R871, FAO, Singapore. (Mimeo).
59. Murthy P.S., Reddy P.V.S., Venkatramaiah A., Reddy K.V.S and Ahmed M.N. (1994), "Methods of mimosine reduction in subabul leaf meal and its utilization in broiler diets". *Indian J. Popultry Sci.* 29: 2, pp. 131 - 137.
60. Nambisan B. And Sundaresan S. Effect of Author: Sigrid Pasteiner. Printed and bound in Austria, (1994), Processing on the cyanoglucoside content of cassava. *Journal of the science of food and Agriculture*, 1985, 36: 11, pp. 1197 - 1203, 18 ref.
61. Narthey F. (1987), Cyanogenesis, Ultrastructure and seed germination. In: Abstract on cassava. Vol. 4, series 183C - 4. CIAT publication, Colombia.
62. Narthey F. (1987). Studies on cassava cyanogenesis. The biosynthesis of phitochemistry. Colombia, pp. 1307 - 1312.
63. Narthey F. (1987). "Cyanogenesis, Ultrastructure and seed Geminatin" Abstract on cassava, Series 183C - 4. CIAT publication, Colombia.
64. NAS (1977), "Leucaena: promising forage and tree for the tropics". *NAS. Washington, DC*: 22 - 37, p. 115.
65. NAS (1984), "Leucaena: promising forage and tree crop for the tropics". *Second Edition. Washington, DC: NAS*, p. 31 - 32; 100.
66. Nataman R and Chandrasekaran D. (1996), "Subabul leaf meal (*Leucaena leucocephala*) as a protein supplement for broiler". *Indian Vet. J.* 73:10, pp. 1042 - 1044.
67. Nguyen Thi Hoa Ly and Nguyen Thi Loc (2000), *Using cassava leaf silage for Mong Cai sows in central Vietnam*. In: Progress in cassava Research and Extension in Vietnam. Vietnam Cassava Workshop, held in Ho Chi Minh city, Vietnam. March 16 - 18. 116 - 123
68. Nguyen Thi Loc, Le Khac Huy, Vu Duy Giang (2001), *Effect of DL - methionine levels in ensiled cassava root-based diets on digestibility and nitrogen balance of cross-bred pigs*. *Science & Technology J. of Agr & Rural Development*. V 10. pp. 441 - 443.
69. Nguyen Van Lai, Rodriguez L, (1988). Digestion and N metabolism in Mong Cai and Large White pigs having free access to sugar cane juice or ensiled cassava root supplemented with ducweed or ensiled cassava leaves, *Livestock Research for Rular Development, CIPAV, colombia*, 10: 2.
70. 105. Norton B.W., Lowry B. and McSweeney C. (1994), The Nutritive value of *Leucaena species*. *Leucaena - Opportunities and Limitation. ACIAR*, pp 103.
71. Oke O.L. (1969), *The role of hydrocyanic acid in nutrition*. *World Rev. Nutr. Diet.* II, pp. 170 - 198.
72. Onibi G.E., Folorunso O.R and Elumelu C. (2008), Assessment of Partial Equi-Protein Replacement of Soyabean Meal with Cassava and Leucaena Leaf Meals in the Diets of Broiler Chicken Finishers. *International Journal of Poultry Science* 7 (4), pp. 408 - 413.
73. Padmavathy P.S and Patil B.D. (1981), "Nodulation and seedling growth in *Leucaena leucocephala* cultivars". *Leucaena Research Reports*. 2, pp. 25.
74. Perez - Gil R.F., Arellano M.L., Bourges R.H and Pinal O.A.M (1987), "Traditional and non - traditional food. II. Chemical composition of *Leucaena leucocephala* and its utilization as human food". *Technol Aliment (Mexico City)*. 22 (1), pp. 20 - 26.

75. Pettersen D.S. & Mackintosh J.B. (1994). *The chemical composition and Nutritive value of Australian Grain legumes*. Grains Research & Development cooperation Canberra, Australia.
76. Pillai S.C., Srinath E.G., Mathur M.L., Naidu P.M.N and Muthanna P.G. (1986). Tapioca spent pulp as an ingredient in poultry feed. *Current Sci.*, 37, pp. 603: 606.
77. Prasert Pojun and Sumon Pojun (1989), "Optimum levels of Leucaena leaf meal in native broiler feeding". *Kaset kaona (Thailand)*, 4 (5): 57 - 70. ISS: 0857 - 3972.
78. Preston T.R & Leng R.A. (1987), "Matching ruminal production systems with available resources in the tropical and sub - tropics". *Penambul books Ltd Armidale NSW, Austraylia*, pp. 120 - 202.
79. Proverbs G. (1984), "Leucaena 'A versatile plant'". *Willey (Barbados)*: CARDI: 34.
80. Rakhee Bhatnagar, Meena Kataria and Verma S.V.S (1996), "Effect of dietary Leucaena leaf - meal (LLM) on the performance and egg characteristics in White Leghorn hens". *Indian J. Anim. Sci.* 66 (12), pp. 1291 - 1294.
81. Randy C.E., Dwight A., Dennis L.H. (1982). The development of digestive capacity in young pig; effect of weaning regimen and dietary treatment. *Journal of Animal Science*. Vol 55. No 6, pp. 1370 - 1379.
82. Ravindran V., Cherry J.A. (1983), Feeding values of cassava tuber and leaf meals. *Nutrition reports International*, 28: 1, pp. 189 - 196, 22 ref.
83. Ravindran V., Kornegay E.T. and Nother D.R. (1984), Cassava leaf meal as a replacement for coconut oil meal in pigs diet. *Journal of the science of food and Agriculture*, 1984, 41: 1, pp. 45 - 53, 24 ref.
84. Ravindran V and Rajaguru A.S.B. (1988), Effect of stem pruning on cassava root yield and leaf growth. *Srilankan Journal of Agricultural Science* 25 (2), pp. 32 - 37.
85. Reddy P.V.S., Reddy V.R., Ahmed N and Sharif S.A. (1995), "Nutritive value and utilization of subabul seed in broiler diets". *Indian Vet. J.* 72: 2, pp. 143 - 145.
86. Ronia E., Endrinal B. and Mendoza T.E.M (1979), "Mimosine levels of different parts and height of Leucaena leucocephala (lam) de Wit (Philippine)". *Philipp. J. of Crop Sci. (Philippine)*. 4 (1), pp. 48 - 52.
87. Rosas H., Quintero S.O and Gomez J. (1980a), "Mimosine disappearance in arboreous Leucaena silage". *Leucaena Newsletter*. 1, pp 17.
88. Ross E and Enriquez F.Q. (1969). The nutritive vaue of cassava leaf meal. *Poultry Science* 48. pp. 846 - 853.
89. Rushkin F.R. (1977), "ed. Leucaena. Promising forage and tree crops for the tropics". *Washington, DC: NAS*.
90. Saentaweesuk S., Kanto U., Juttupornpong S. and Harinsut P., (2000a), *Substitution of cassava meal for corn in broiler diets*. In: Proc. 38th Kasetsart University Conference, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
91. Saentaweesuk S., Kanto U., Juttupornpong S. and Harinsut P. (2000b), *Substitution of cassava meal for corn in broiler diets*. In: Proc. 38th Kasetsart University Conference, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
92. Serrano E.P., Ilag L.L and Mendoza E.M.T (1983), "Biochemical mechanisms of mimosine toxicity to *Siderotium rolfsii*". *Sacc. Aust. J. Biol. Sci.* 36. pp. 445- 454.

93. Sethi P. (1989), Nutritional and biochemical aspects of *Leucaena leucocephala*. Doctoral thesis, Department of Chemical Technology, University of Bombay.
94. Sethi P. and Kulkarni P.R. (1995), "Leucaena leucocephala: A nutrition profile". *Food Nutr. Bulletin*. 16 (3) pp. 224 - 237.
95. Sharif S.A., Reddy P.V.S., Naidu M.A., Reddy K.V.S and Ahmed N.M (1995), "Utilization of subabul (*Leucaena leucocephala*) seed meal in broiler diets". *Indian J. Poultry Sci.* 30 (3), pp. 205 - 212.
96. Smith I.K and Fowden (1966). "A study of mimosine toxicity in plants". *J. Exp. Bot.* 17 (53), pp. 750 - 761.
97. Soedarjo M and Bortharkur D (1996), "Simple procedures to remove mimosine from young leaves, pods and seed of *Leucaena leucocephala* used as food". *Int. J. Food Sci. Technol.* 31 (1), pp. 97 - 103.
98. Steveson M.H and Jackson M. (1983). The nutritional value of diet dried cassava root meal in broiler diets. *J. Sci. Food agric.* 34, pp. 1361- 1367.
99. Szyska M., Manfred ter Meulen V and El - Harith A. (1983), "*The possibilities safe application of Leucaena leucocephala in the diets of productive livestock*". *Leucaena leucocephala Research Reports*, 4, pp. 13 - 16.
100. Szyska M., ter Meulen, U., Boonlm Cheva - Isarakul., Posri S and Potikanond N. (1984), "Results of research on *Leucaena* as an animal feed in west Germany". *Leucaena Research Reports*. 5. pp. 5 - 11.
101. Tait R.M and Beames R.M. (1988), Processing and preservation of cereals and protein concentrates. *World Animal Science. Feed Science. Amsterdam - Oxford - New York - Tokyo*, pp. 151.
102. Takahashi M and Ripperton J.C (1949), "Kao haole (*Leucaena glauca*), its establishment, culture, and utilization as forage crop". *Hawaii Agric. Exp. Station. Bulletin* 100.
103. Tangendjaja B and Lowry J.B (1984). "Usefulness of enzymatic degradation of mimosine in *Leucaena* leaf for monogastric animals". *Leucaena Research Reports*. 5, pp. 55 - 56.
104. Tangendjaja B and Sarmanu (1986), "*Effect of Leucaena leaf meal and pure mimosine on sexual maturity of layers*". *Leucaena Research Reports*. 7, pp. 83 - 84.
105. Tathawan S., Moonchaisuk S., Tanasrisutarat N., Kanta U. and Juttupornpong S. (2002), A comparative study of corn and cassava diets both supplemented and unsupplemented with antibiotic on performance and mortality rate of broiler. In: Proc. 40th Kasetsart University Conference, Kasetsart University, bangkok, Thailand.
106. Tawata S., Hongo F., Sunagawa K., Kawashima Y and Yaga S. (1986), "A simple reduction method of mimosine in the tropical plant *Leucaena*". *Sci. Bull. Coll. Agric. Univ. Ryukyus.* 33, pp. 87 - 94.
107. Tejada de Hernandez I. and Brambila S. (1969). *Técnical Pecuaria en México* 12 - 13, pp. 5 - 11.
108. Ter Meulen U., Struck S., Schulke E. and El - Harith E.A (1979), "A review on the nutritive value and toxic aspects of *Leucaena leucocephala*". *Trop. Anim. Prod.* 4, pp. 113 - 126.
109. Ter Meulen U., Glinther K.D and El - Harith E.A. (1981), "*Metabolic effects mimosine on tyrosine in the rat*". *Z Tierphysiol Tierenahrh Futtermittelkde.* 46, pp. 264 - 269.

110. Ter Meulen U., Pucher F., Szyszka M. and El - Harith E.A (1984), "Effects of administration of Leucaena meal on growth performance of, and mimosine accumulation in, growing chicks. Arch". *Gefluegelkd.* 48, pp. 41 - 44.
111. Tobayayong T.T. (1935), The value of cassava refuse meal in the ration for growing chicks. *Philipp. Agric.* 24, pp. 509.
112. Tsai W.C and Ling K.H. (1971), "Toxic action of mimosine. I. Inhibition of mitosis and DAN synthesis of H. Ep - 2 cell by mimosine and 3,4 - dihydroxypyridine". *Toxicology*; 9, pp. 241 - 247.
113. Tsai W.C and Ling K.H. (1972), "Toxic action of mimosine. II. Factors which influence the mimosine toxicity to the H. Ep - 2 cell". *J. Formos Med. Assoc.* 71, pp. 23 - 30.
114. Tsai W.C and Ling K.H. (1973), "Stability constants of some metal iron chelates of mimosine and 3,4 - dihydroxy pyridine". *J. Chin. Biochem. Soc.*, 2, pp. 70 - 86.
115. Upase B.T and Jadhav A.J. (1994), "Effect of subabul leaf meal feeding on sexual maturity, feed and economical efficiency of growing layer chicks". *Poultry - Adviser*, 27 (10), pp. 33 - 36.
116. Wanapat M., Somwart K., Wachira pakoin C., Chauthai S. (1993), Utilization of cassava leaf (*Manihot esculenta* Crantz) in Concentrate mixtures for swamp buffaloes ruminant productivity in areas of fluctuating nutrient supply. FAO/ IAEA - Vienna. Austria.
117. Wee K.L and Wang S. (1987), "Affect of post - harvest treatment on the degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala* leaves". *J. Sci. Food Agric.* 39, pp. 195 - 201.
118. Wigan G.C., Batterham E.S. and Farrell D.J. (1994). *Nutritive value of lupins angustifolius (cv. Gunguru) for growing pigs*. Proceeding of the fifth Biennial pig. Industry Seminar, WAL. pp. 38 - 46.
119. Wondra K.J., Hancock J.D., Behnke K.C., Hines R.H and Stark C.R. (1995). Effect of particle size and pelleting on growth performance, nutritient digestibility and stomach morphology in finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 73, pp. 757 - 763.
120. Wong H.K and Wan Zahari W.M (1995), "Degradation of toxic dihydroxypyridine compound from *Leucaena leucocephala* by a rumen bacterium (Malaysia)". *Malaysia J. Anim. Sci.* 1 (1), pp. 50 - 54.
121. Yang S.S and Ling K.H. (1968), "Excretion of kynurenic and xanthurenic acid by mimosine - intoxicated rats after L - tryptophan loading". *J. Formos Med. Assoc.* 67, pp. 315 - 318.
122. Yoshida R.K (1944), A chemical and physiological study of the nature and properties of the toxic principle in *Leucaena leucocephala* (Kao Haole). Doctoral thesis, University of Minnesota, Minneapolis, Minn, USA.

Chịu trách nhiệm xuất bản
TS. LÊ QUANG KHÔI

Phụ trách bản thảo
LÊ LÂN - ĐÌNH THÀNH

Trình bày, bìa
VĂN TOÀN

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
167/6 Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội
ĐT: (04) 38523887, (04) 38521940 - Fax: 04.35760748
E - mail: nxbnn@yahoo.com.vn

CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
58 Nguyễn Bình Khiêm - Q.I - Tp. Hồ Chí Minh
ĐT: (08) 38299521, 38297157 - Fax: (08) 39101036

$\frac{63-630}{NV-2012}-357/08-2012$

In 215 bản khổ 19×27cm tại Công ty cổ phần in và TM Đông Bắc. Đăng ký KHXB số 225-2012/CXB/357-08/NN ngày 6/3/2012. Quyết định XB số: 39/QĐ-NN ngày 24/4/2012. In xong và nộp lưu chiểu quý II/2012.