

CHẾ TẠO OLIGOCHITOSAN “CHẤT KÍCH KHÁNG BỆNH CHO CÂY TRỒNG VÀ VẬT NUÔI” BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ TIA GAMMA Co-60

Nguyễn Quốc Hiến*

Đặng Văn Phú**

TÓM TẮT: Chitosan được chế tạo từ chitin vỏ tôm, cua bằng phương pháp đề axêtyl hóa trong dung dịch kiềm đặc. Oligochitosan được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 cắt mạch chitosan trong dung dịch chứa hàm lượng nhỏ hydro peroxit (~0,5%). Phương pháp chiếu xạ được đánh giá là hiệu quả để áp dụng chế tạo oligochitosan qui mô sản xuất. Oligochitosan thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh hiệu quả đối với cây trồng và kích thích hệ miễn dịch đối với vật nuôi. Bài báo trình bày một số kết quả điển hình về hiệu ứng kích kháng bệnh và tăng trưởng của oligochitosan đối với cây trồng (lúa) và vật nuôi (heo, gà, cá). Oligochitosan là hoạt chất sinh học rất triển vọng sử dụng làm chất kích kháng bệnh, tăng trưởng cho cây trồng, vật nuôi để sản xuất nông phẩm an toàn và phát triển nông nghiệp môi trường bền vững.

1. Mở đầu

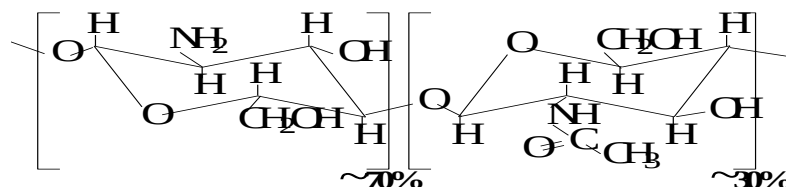
Chitosan là dẫn xuất của chitin, được tạo ra do quá trình đề acetyl hóa chitin chủ yếu từ vỏ tôm, cua. Hiện nay, chitosan là một trong những hoạt chất tự nhiên đã và đang được ứng dụng khá phổ biến trong các lĩnh vực như nông nghiệp, y tế, dược phẩm và mỹ phẩm, ... [1] Rinaudo]. Oligochitosan được chế tạo chủ yếu là cắt mạch chitosan bằng các phương pháp khác nhau như thủy phân bằng enzym, dùng các tác nhân hóa học và tia bức xạ, ... [2,3]. Oligochitosan được ghi nhận là có hoạt tính kích kháng bệnh cho vật nuôi và cây trồng [4,5].

Chất kích kháng bệnh thực vật (plant elicitor) là những chất làm gia tăng khả năng chống nhiễm bệnh đối với cây trồng. Chất kích kháng bệnh thông thường được chia làm hai loại, loại thứ nhất gọi là “abiotic” bao gồm tia UV, nhiệt, ... và loại thứ hai là “biotic” bao gồm những hoạt chất chiết ra từ vi sinh vật, động vật hoặc là từ cây, tảo, ... Trên cơ sở nguồn gốc xuất xứ, chất kích kháng bệnh sinh học (biotic elicitor) lại được chia làm hai loại gọi là chất kích kháng ngoại bào (exogenous elicitor) và chất kích kháng nội bào (endogenous elicitor). Oligochitosan thuộc vào loại chất kích kháng ngoại bào và thể hiện hoạt tính kích kháng bệnh đối với cây trồng cao hơn so với chất kích kháng nội bào ví dụ như oligoalginat, oligopectin, ... [6]. Trong ngành chế biến thức ăn cho vật nuôi (heo, gà, cá, ...), oligochitosan được bổ sung vào thức ăn làm

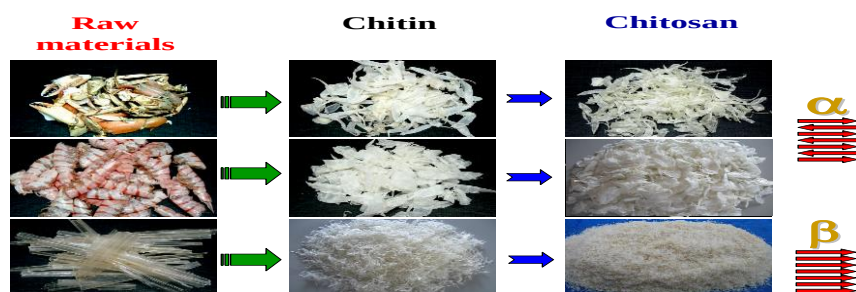
* PGS TS, Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam.

** Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam.

tăng hiệu quả sử dụng thức ăn đối với vật nuôi do làm gia tăng nhóm vi sinh có lợi như *Bacillus*, *Lactobacillus*,... và ức chế các vi khuẩn có hại như *E. coli*, *salmonella*,... trong hệ thống tiêu hóa. Hơn nữa, oligochitosan làm gia tăng hệ miễn dịch, gia tăng sự chống chịu với vi khuẩn gây bệnh, và thay thế cho các chất kháng sinh, tăng trọng không an toàn.



Hình 1. Cấu trúc phân tử của chitosan với độ acetyl ~70%



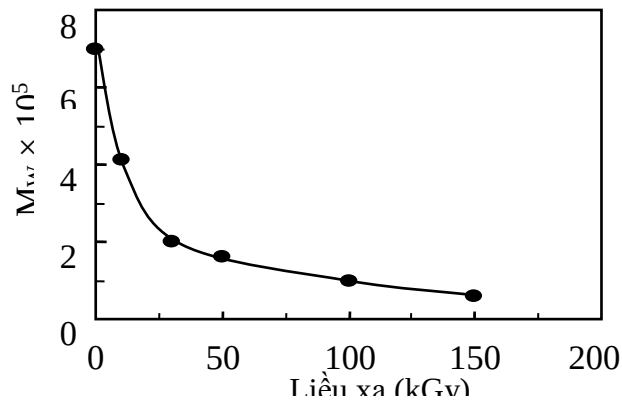
Hình 2. Nguyên liệu vỏ tôm, cua, mai mực và chitin/chitosan

Nghiên cứu sử dụng oligochitosan ở nhiều lĩnh vực khác nhau trong những năm gần đây đang được phát triển đặc biệt là ngành công nghiệp thực phẩm và ngành nuôi trồng thủy sản, chăn nuôi gia súc, gia cầm.

2. Cắt mạch bức xạ chitosan chế tạo oligochitosan

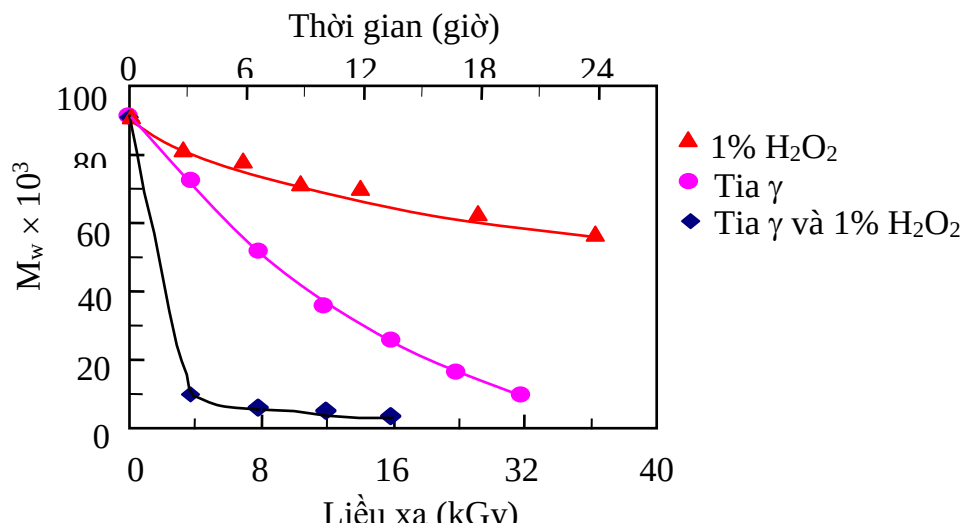
Xử lý biến tính bức xạ polysacarit chủ yếu là cắt mạch tạo ra các polyme khối lượng phân tử (KLPT) thấp và/hoặc là oligome từ các polysacarit tương ứng. Xử lý bức xạ các dẫn xuất của polysacarit (carboxyl metyl,...) không những cắt mạch giảm KLPT mà còn khâu mạch tạo mạng lưới không gian ba chiều, điển hình là chế tạo vật liệu hydrogel (gen ưa nước). Ngoài ra biến tính ghép bức xạ polysacarit với các loại monome sẽ tạo ra hàng loạt sản phẩm cho các mục đích ứng dụng khác nhau. Polysacarit tự nhiên với trữ lượng lớn và là vật liệu tái tạo sẽ là nguồn nguyên liệu tiềm năng để xử lý biến tính bức xạ quy mô sản xuất công nghiệp.

Nghiên cứu biến tính cắt mạch chitosan tạo chitosan có KLPT thấp và oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ sử dụng tia Gamma Co-60 và chùm tia điện tử gia tốc đã và đang được tiến hành ở nhiều trung tâm công nghệ bức xạ trong khu vực Châu Á - Thái Bình Dương và trên thế giới. KLPT trung bình khối lượng (M_w) từ khoảng 10.000 đến 100.000 được xem là chitosan KLPT thấp, trong khi đó M_w của oligochitosan thường nhỏ hơn 10.000.



Hình 3. Sự suy giảm KLPT của chitosan chiếu xạ tia Gamma Co-60 theo liều xạ

Kết quả Hình 3 cho thấy chitosan KLPT thấp có thể dễ dàng chế tạo thông qua chiếu xạ chitosan KLPT cao dạng bột hoặc là dạng vảy [3]. Oligochitosan được chế tạo chủ yếu là chiếu xạ dung dịch chitosan. Chi phí chế tạo oligochitosan bằng phương pháp enzym thông thường cao hơn so với phương pháp cắt mạch bằng tác nhân hóa học. Tuy nhiên, phương pháp hóa học cũng có nhược điểm là làm thay đổi cấu trúc của chitosan do tạo nhóm chức carboxyl, phân hủy nhóm $-NH_2$ và thậm chí là phá vỡ vòng glucosit. Hơn nữa, phương pháp hóa học còn có một số hạn chế do hiệu suất tạo oligochitosan thấp và có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường. Phương pháp bức xạ để cắt mạch chitosan dạng bột tạo oligochitosan thường phải cần liều xạ rất cao và điều này không thuận lợi để ứng dụng sản xuất. Do vậy để chế tạo oligochitosan hiệu quả thì hiệu ứng cắt mạch đồng vận (synergistic effect) bằng hydroperoxit (H_2O_2) kết hợp với bức xạ gamma được nghiên cứu và áp dụng [7].



Hình 4. Sự suy giảm KLPT chitosan trong dung dịch 5% xử lý với H_2O_2 , tia γ và H_2O_2 /tia γ theo thời gian và liều xạ (suất liều: 1,33 kGy/h)

Kết quả Hình 4 cho thấy hiệu ứng đồng vận của H_2O_2 / tia γ cắt mạch chitosan trong dung dịch thì liều xạ chỉ khoảng dưới 16 kGy đã nhận được oligochitosan với

$M_w < 10.000$. Như vậy sử dụng hiệu ứng đồng vận (H_2O_2 /tia γ) đã làm giảm liều xạ chế tạo oligochitosan đóng góp giảm giá thành, tạo điều kiện thuận lợi để chế tạo oligochitosan qui mô sản xuất.

3. Hiệu ứng kích kháng bệnh và tăng trưởng của oligochitosan đối với cây trồng

3.1. Xử lý phun lá lúa: Cây lúa non khoảng 15-20 ngày tuổi được phun oligochitosan nồng độ 30 ppm sau đó phun nhiễm bệnh đạo ôn cháy lá (*P. grisea*) nồng độ bào tử khoảng 10^5 CFU/ml. Kết quả nhận được trong bảng 1 cho thấy tỷ lệ lá lúa bị bệnh đạo ôn cháy lá đều giảm có ý nghĩa ở các nghiệm thức xử lý oligochitosan. Như vậy chứng tỏ oligochitosan được chế tạo từ chitosan cắt mạch bằng phương pháp chiếu xạ đã thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh đối với cây lúa [8].

Bảng 1. Tỷ lệ diện tích lá lúa bị bệnh đạo ôn cháy lá (*P. grisea*) sau 5 ngày gây nhiễm

TT	Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh, %	% so với ĐC
1	Oligochitosan M_w 8.600	4,03 b	40,6
2	Oligochitosan M_w 5.600	4,80 b	48,3
3	Oligochitosan M_w 3.600	4,91 b	49,5
4	ĐC (phun nước)	9,93 a	100

3.2. Xử lý hạt giống lúa

Hạt giống lúa xử lý với chitosan và oligochitosan, sau nảy mầm 18 ngày cho nhiễm bệnh đạo ôn cháy lá (*P. grisea*) và xác định chỉ số nhiễm bệnh. Kết quả bảng 2 chứng tỏ rằng xử lý hạt giống lúa bằng chitosan và oligochitosan đã gây tạo hiệu ứng kích kháng bệnh đối với cây lúa và oligochitosan gây tạo hiệu ứng cao hơn so với chitosan [9].

Bảng 2. Chỉ số nhiễm bệnh đạo ôn cháy lá (*P. grisea*) sau 7 và 14 ngày gây nhiễm

Nghiệm thức	Đối chứng		Chitosan		Oligochitosan	
	7 ngày	14 ngày	7 ngày	14 ngày	7 ngày	14 ngày
Chỉ số bệnh	2b	4d	1b	2c	0a	1b

Ngoài ra khi xử lý hạt giống lúa bằng oligochitosan còn làm gia tăng tỷ lệ nảy mầm từ 88,0 lên 94,4% và sinh khối tươi của cây mạ non từ 1,18 lên 1,70 g/cây so với đối chứng không xử lý oligochitosan.

3.3. Ứng dụng đồng ruộng oligochitosan trong sản xuất lúa

Bảng 3. Hiệu ứng kích kháng bệnh đạo ôn (*P. grisea*) và tăng năng suất lúa khi xử lý phun lá oligochitosan (5 lần/vụ lúa).

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh, %	Năng suất, tấn	% tăng năng suất
Oligochitosan, 30 ppm	7,6	4,8	0
ĐC (nước)	18,3	3,9	23

Kết quả bảng 3 cho thấy oligochitosan thể hiện hoạt tính kích kháng bệnh cao làm giảm chỉ số bệnh đạo ôn đối với cây lúa (7,6) so với lô đối chứng không phun oligochitosan (18,3), năng suất lúa gia tăng khoảng 20%.

Bảng 4. Năng suất lúa xử lý với nông dước và oligochitosan

Nghiem thức	Năng suất trung bình, kg	% so với ĐC 1	% so với ĐC 2
ĐC 1 (nước)	143	-	-
ĐC 2 (nông dước)	163	13,9	-
Oligochitosan (30 ppm)	163	13,9	0,0
Oligochitosan (100 ppm) xử lý hạt giống + phun oligochitosan (30 ppm) lên mạ và cây lúa	181	26,6	11,0

Kết quả bảng 4 cho thấy phun lá oligochitosan có thể thay thế phun hóa chất nông dước. Xử lý hạt giống lúa kết hợp phun lá oligochitosan cho hiệu quả tối ưu.



Hình 5. Khảo nghiệm đồng ruộng hiệu ứng kích kháng bệnh và tăng trưởng của oligochitosan đối với cây lúa



Hình 6. Sản phẩm thương mại oligochitosan RISAZA kích kháng bệnh cho cây lúa, cây mía

Đặc trưng tính chất của sản phẩm kích kháng bệnh oligochitosan RISAZA:

- Dạng sản phẩm: Dung dịch
- Nồng độ oligochitosan: 30 g/L (~30.000 ppm)
- KLPT Mw: $4 - 8 \times 10^3$
- pH: ~ 5,0-6,0
- Cảm quan: Chất lỏng màu vàng, trong
- Hạn sử dụng: 2 năm



Hình 7. Áp dụng oligochitosan xử lý hạt giống lúa và cây mạ non trong sản xuất

3.4. Hiệu ứng kích kháng bệnh của oligochitosan đối với một số loại cây trồng

Bảng 6 đưa ra kết quả khả năng kích kháng chống nhiễm bệnh của một số loại cây trồng của oligochitosan [5].

Bảng 6. Hiệu ứng kích kháng bệnh của oligochitosan đối với một số loại cây trồng

Loại cây	Loại bệnh	Mức độ kiểm soát bệnh (%)
Thuốc lá	Virus khảm thuốc lá	76,49 – 87,5
Sâm tam thất	Bệnh do virus	>90
Hoa tulíp	Mốc sương	84,24 – 88,6
Tiêu đen	Virus khảm	73,54 – 81,3
Cà chua	Lở cổ rễ, mốc sương, bệnh do virus, héo rũ	84,47 – 88,24
Dưa chuột	Mốc sương	78,96 – 82,65
Tiêu	Bệnh do virus, thối, thán thư, héo rũ – cháy lá	78,58 – 90
Cà tím	Bệnh do virus	93,18 – 100
Cải bắp	Bệnh thối nhũn	78,62 – 85
Măng tây	Mốc sương	45,80 – 62,30
Bí đao	Thối trái	84,81 – 95
Xúp lơ	Đốm đen	63,60 – 64,20
Bí xanh	Thối trái	45,50 – 57,60
Đậu trắng	Bệnh do virus	31,13 – 58,80
Đu đủ	Virus khảm	70 – 96
Dưa hấu	Đốm đen, bệnh do virus, đốm lá chảy nhựa thân	81,71 – 85,40
Dưa hương	Bệnh đốm trắng	71,34 – 86,26
Chuối	Bệnh chun đọt chuối	83,70 – 94,60
Táo	Virus khảm, ghè táo	76,68 – 93,85
Đậu	Bệnh do virus	75,10 – 100
Bông vải	Bệnh héo vàng	85,50 – 87,20
Ngô	Bệnh cháy bìa lá	23,90 – 45,35
Lúa	Đạo ôn cháy lá	71,41 – 92
Đậu phộng	Bệnh do virus	23,90 – 26,50

3.5. Ứng dụng oligochitosan trong nuôi cấy mô tế bào thực vật



Hình 8. Hiệu ứng tăng trưởng của oligochitosan trong nuôi cấy mô tế bào cây dứa

Sử dụng oligochitosan nồng độ 40 ppm trong môi trường nuôi cấy mô tế bào cây dứa cho thấy hiệu ứng tăng trưởng rất cao (hơn ba lần). Ngoài ra oligochitosan cũng được ứng dụng để kích thích tăng trưởng trong nuôi cấy mô tế bào nhiều loại cây khác [10,11].

4. Hiệu ứng kích kháng bệnh và tăng trọng đối với vật nuôi

Bảng 7. Hiệu ứng tăng trọng, giảm tỷ lệ chết và tăng hiệu quả sử dụng thức ăn của oligochitosan trong chăn nuôi gà [12]

Các thông số	ĐC	Oligochitosan
Số gà nuôi khảo nghiệm (con)	2.000	2.000
Trọng lượng trung bình (kg/con)	1,87 ± 0,63	2,17 ± 0,92
Tỷ lệ gà chết (%)	6,32 ± 0,19	4,56 ± 0,05
Tỷ lệ thức ăn/tăng trọng (kg/kg)	2,07	1,85
Tỷ lệ tăng trọng trung bình (g/con/ngày)	41,56	48,22

Bảng 8. Hiệu ứng tăng trọng, giảm tỷ lệ chết và tăng hiệu quả sử dụng thức ăn của oligochitosan trong chăn nuôi heo sau 50 ngày.

Các thông số	ĐC	Oligochitosan
Số heo nuôi khảo nghiệm (con)	36	36
Trọng lượng trung bình (kg/con)	30,20 ± 0,25	32,30 ± 0,31
Tỷ lệ thức ăn/tăng trọng (kg/kg)	1,73	1,46
Tỷ lệ tăng trọng trung bình (kg/con/ngày)	0,502	0,544
<i>E. coli</i> (logCFU/g phân heo)	7,24	6,61
<i>Lactobacilus</i> (logCFU/g phân heo)	9,46	10,62

Bảng 9. Hiệu ứng kích kháng bệnh của oligochitosan đối với cá rôphi (*Oriochromis sp.*) gây nhiễm bệnh nhân tạo vi khuẩn *Strep. agalactidae* (10^6 CFU/ml).

Oligochitosan (mg/kg thức ăn)	0 (ĐC)	50	100	150
Tỷ lệ chết, %	56,25	37,67	24,65	24,37

Kết quả bảng 9 cho thấy sử dụng oligochitosan hàm lượng 100 ppm (0,1g oligochitosan/1kg thức ăn) cho hiệu ứng kích kháng bệnh tối ưu [13].

Bảng 10. Hiệu tăng trọng của oligochitosan đối với cá rôphi (*Oriochromis sp.*)

Nghiệm thức	Trọng lượng cá trung bình (g/con)		
	30 ngày	60 ngày	90 ngày
ĐC	20	29	48
Oligochitosan	18	38	74

Kết quả bảng 10 cho thấy oligochitosan không những thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh mà còn thể hiện hiệu ứng tăng trọng đối với cá rô phi.

Như vậy sử dụng oligochitosan bổ sung vào thức ăn cho gia súc cụ thể là heo, gà, cá, ... đã gây tạo hiệu ứng kích kháng bệnh, làm gia tăng hiệu quả sử dụng thức ăn thông qua sự gia tăng vi khuẩn đường ruột có ích *Lactobacillus* và làm giảm số lượng vi khuẩn có hại *E. coli* và cuối cùng là tăng trọng cho heo, gà, cá và đạt hiệu quả kinh tế cao hơn. Ngoài ra khi sử dụng oligochitosan đã làm giảm thiểu hoặc là không sử dụng các chất kháng sinh và chất tăng trọng tổng hợp góp phần nâng cao chất lượng và độ an toàn của thịt heo, gà, cá, ... Ngoài ra chitosan và oligochitosan còn thể hiện hoạt tính sinh học được ứng dụng trong các lĩnh vực khác như hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống oxy hóa, ... [14].

5. Kết luận

Oligochitosan được chế tạo từ chitosan bằng các phương pháp cắt mạch khác nhau. Phương pháp kết hợp chiếu xạ gamma Co-60 dung dịch chitosan/H₂O₂ là rất hiệu quả, có khả năng phát triển sản xuất qui mô lớn đáp ứng nhu cầu sử dụng. Oligochitosan chế tạo được đã thể hiện hoạt tính kích kháng bệnh đối với cây trồng và vật nuôi (heo, gà, cá, ...). Nhằm ứng dụng rộng rãi oligochitosan chất kích kháng bệnh sinh học an toàn cho vật nuôi, cây trồng, cần tiếp tục khảo nghiệm đối các loại rau quả và cây trồng khác như cây tiêu, ớt, cà phê, ... cũng như các loại vật nuôi khác như tôm, bò sữa,... nhằm xác định liều lượng oligochitosan đạt hiệu quả kích kháng bệnh tối ưu. □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, Progress in Polymer Science, 31(7), pp. 603-632, 2006.
2. S.K. Kim, N. Rajapaskse, Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review, Carbohydrate Polymers, 62, pp. 357-368, 2005.
3. N.Q. Hien và nnk, Nghiên cứu chế tạo oligochitosan bằng kỹ thuật chiếu xạ, Tạp chí Hóa học, T. 38 (2), tr. 22-24, 2000.
4. R. Huang et al., Dietary oligochitosan supplementation enhances immune status of broiler, Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, pp.153–159, 2007.
5. H. Yin, X. Zhao, Y. Du, Oligochitosan: A plant vaccine - A review, Carbohydrate Polymers, 82, pp. 1-8, 2010.
6. C. Akimoto et al., Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells, Applied Microbiology and Biotechnology, 118, pp. 1353-1359, 1999.
7. N.Q. Hien, D.V. Phu, n.N. Duy, N.T.K. Lan, Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide, Carbohydrate Polymers, 87, pp. 935-938, 2012.

8. N.Q. Hien và cs, Nghiên cứu xử lý hóa học kết hợp với bức xạ chế tạo chất kích kháng bệnh sinh học dùng trong nông nghiệp cho cây lúa và cây mía, Báo cáo tổng kết Đề tài Cấp Bộ MS: BO/06/07-01, 2011.
9. A.T. Rodriguez et al., Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cook) Sacc. By treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan, Pesticide Biochemistry and Physiology, 89, pp. 206-215, 2007.
10. L.Q. Luan et al., Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro. Biotechnology and Applied Biochemistry, 41, pp. 49-57, 2005.
11. K.L. Nge, Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture, Plant Science, 170, pp. 1185-1190, 2006.
12. P. Wanichpongpan, K. Chantrapromma, Application of chitosan as broiler growth promoter, Advances in Chitin Science, pp. 524-527, 2002.
13. N.N. Duy và cs, Nghiên cứu hiệu ứng kháng bệnh của chitosan cắt mạch bằng phương pháp chiếu xạ đối với cá rô phi, Báo cáo tổng kết Đề tài Cấp cơ sở MS: CS/07-02, 2011.
14. W. Xia et al., Bioactivities of chitosan and chitoooligosaccharides, Food Hydrocolloids, 25, 170-179, 2011.

Abstract

Chitosan is a carbohydrate biopolymer prepared from shrimp and crab chitin by deacetylation process. Oligochitosan was produced by gamma ray Co-60 irradiation of Chitosan in solution containing small amount of hydrogen peroxide. The irradiation method for degradation of Chitosan proved to be effective for large scale production. Oligochitosan exhibits potent elicitation effect for plants and also immuno-stimulant effect for domestic animals. Typical results on elicitation and growth-promotion effect of Oligochitosan on plants (rice) were outlined. Furthermore, the effect of Oligochitosan on domestic animal (chicken, pig and fish) was also presented. Thus, Oligochitosan, a bioactive substance, is promising for application as plant and domestic animal vaccine for sustainable development of agriculture.