NGHIÊN CỨU HIỆU ỨNG KÍCH KHÁNG BỆNH CỦA β-GLUCAN CẮT MẠCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ ĐỐI VỚI CÁ RÔ PHI

Nguyễn Ngọc Duy*, Nguyễn Quốc Hiến, Đặng Văn Phú

Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ bức xạ, 202A,

Đường 11, P. Linh Xuân, Q. Thủ Đức, Tp. HCM

Email: *ngocduy158@yahoo.com*

Đến Toà soạn: 22/2/2013; Chấp nhận đăng: 10/11/2013

TÓM TẮT

β-glucan khối lượng phân tử thấp (LMWβG) và dung dịch oligoβ-glucan đã được chế tạo bằng phương pháp hấp thủy nhiệt kết hợp với phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60. Ảnh hưởng quá trình cắt mạch đến sự thay đổi khối lượng phân tử (KLPT) đã được xác định bằng sắc kí gel thấm qua (GPC). Kết quả thu được cho thấy KLPT giảm khi tăng thời gian hấp, nồng độ H_2O_2 và liều xạ. Đối với LMWβG KLPT giảm từ 296.600 Da xuống 44.400 Da khi nồng độ H_2O_2 tăng từ 0 lên tới 10 % và đối với oligoβ-glucan KLPT giảm từ 56.700 xuống còn 7.100 Da khi chiếu xạ dung dịch β-glucan/1 % H_2O_2 tại liều xạ 16 kGy. Cá rô phi được cho ăn thức ăn có bổ sung LMWβ và oligoβ-glucan ở hàm lượng 100 mg/kg thức ăn trong vòng 45 ngày và sau đó được gây nhiễm bệnh với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* để khảo sát hiệu ứng kích kháng bệnh. Kết quả cho thấy oligoβ-glucan có hiệu ứng kích kháng bệnh cao hơn LMWβ và tại hàm lượng 150 mg/kg thức ăn, tỉ lệ cá sống sót sau khi gây nhiễm bệnh đạt cao nhất (76,75 %) đối với oligoβ-glucan

Từ khóa: β-glucan, oligoβ-glucan, miễn dịch, gamma Co-60.

1. MỞ ĐẦU

Các chất kích thích hệ miễn dịch đã được sử dụng rộng rãi trong các trang trại để tăng cường sức đề kháng cho vật nuôi.. Sự tăng cường khả năng miễn dịch chống lại các tác nhân gây bệnh này không phải là sự tăng cường đáp ứng miễn dịch cụ thể mà bằng cách tăng cường các cơ chế bảo vệ không đặc hiệu tế bào và miễn dịch dịch thể. Men β-1,3 glucan đã được chứng minh là chất có khả năng tăng cường hệ miễn dịch chống lại các tác nhân gây bệnh chủ yếu do vi khuẩn *Vibrio anguillarum, Vibrio salmonica, Yersinia ruckeri, Edwardsiella tarda và Aeromonas hydrophila* trong một số loài cá như cá chép *Cyprinus carpio* [1], cá hồi Đại Tây

Dương *Salmo salar* [2], đuôi vàng *Seriola quinqueradiata* [3], cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* [4], cá hồi suối *Salvelinus fontinail* [5], và cá da trơn Afican, *Clarius gariepinus* [6].

Các chất kích thích và điều hòa hệ thống miễn dịch bao gồm nhóm các hợp chất sinh học tự nhiên và tổng hợp có khả năng tăng cường các cơ chế bảo vệ tế bào và miễn dịch dịch thể đặc hiệu ở động vật có vú. Những chất như levamiso, β-glucan, peptidoglican, chitin, men β-glucan và kết hợp vitamin cũng như các sản phẩm khác nhau có nguồn gốc từ thực vật và động vật có hiệu quả trong việc ngăn ngừa bệnh [7, 8]. Hầu hết các nghiên cứu về các chất kích thích hệ miễn dịch đã tập trung vào việc điều trị các khối u trong con người và động vật [9]. Cơ chế điều trị khối u là tạo ra các chất có khả năng tăng cường hệ miễn dịch từ các hoạt động của đại thực bào, bạch cầu trung tính có khả năng tiêu diệt khối u, tăng sức đề kháng khi bị nhiễm virus, vi khuẩn và nấm [10, 11]

β-glucans là polisaccarit được cấu tạo từ các monome D-glucozơ liên kết với nhau bằng liên kết β-glucozit. Các β-glucan được cấu tạo từ nhiều phân tử với liên kết khác nhau và chúng được phân biệt qua khối lượng phân tử (KLPT), khả năng hòa tan, độ nhớt và cấu trúc không gian 3 chiều. β-glucan trong thực vật phong phú như xenlulozơ, chúng thường được điều chế từ ngũ cốc, thành tế bào của nấm men, một vài loài nấm ăn hay trong vi khuẩn hoặc nấm bệnh. Nấm men và nấm dược liệu được biết đến như là những chất có khả năng điều chỉnh và tăng cường hệ thống miễn dịch. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy (1,3/1,6) β-glucan không hòa tan có hoạt tính sinh học cao hơn (1,3/1,4) β-glucan hòa tan [2]. Sự khác biệt giữa các loại liên kết của β-glucan và cấu trúc hóa học ảnh hưởng đáng kể đến độ tan của β-glucan và hoạt tính sinh học. Trong nuôi trồng thủy hải sản β-glucan thường được sử dụng như là chất kích thích hệ thống kháng thể để bảo vệ vật nuôi khỏi dịch bệnh [5, 6, 7]. Mục đích của nghiên cứu này là chế tạo β-glucan KLPT thấp (LMWβG) và oligoβ-glucan bổ sung vào thức ăn nuôi cá rô phi, tiếp theo là khảo sát khả năng kích kháng bệnh của cá khi được gây nhiễm bệnh bằng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Bã men bia (Saccharomyces uvarum) được mua từ nhà máy bia Sài gòn. Hydrogen peroxit (H_2O_2), nước tinh khiết là sản phẩm của hãng Merck, Đức. Cá rô phi được mua từ một trang trại ở tỉnh Bình Dương. Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được phân lập từ cá bệnh ở tỉnh Đồng Tháp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chế tạo β-glucan: β-glucan được chiết từ bã men bia bằng dung dịch kiềm theo quy trình của Suphantharika et al (2003) [12]. Điều kiện tách chiết tối ưu là nhiệt độ 90 ^{0}C, nồng độ NaOH 1N và tỉ lệ dung dịch NaOH/bã men bia là 5 : 1 (v/w). Sản phẩm sau khi tách chiết được li tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút, sau đó tách phần dung dịch lấy phần rắn rửa sạch bằng nước, li tâm và sấy khô nhận được chế phẩm bột β-glucan. Hàm lượng β-glucan trong chế phẩm bột khô là khoảng 51 %.

Chế tạo dung dịch LMWβG: Bột β-glucan được ngâm trương trong dung dịch H_2O_2 với các nồng độ: 0; 2,5; 5,0; 7,5 và 10 %. Mẫu β-glucan trương trong dung dịch H_2O_2 được hấp thủy

nhiệt trong thời gian 30 phút, nhiệt độ 125 ^{0}C và 1,3 atm. Lọc dung dịch sau khi hấp nhận được dung dịch LMWβG.

Chế tạo dung dịch oligoβ-glucan: Hydrogen peroxit ở các nồng độ khác nhau từ 0,5 đến 5 % được cho vào dung dịch LMWβG. Các mẫu được hấp thủy nhiệt trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 125 ^{0}C và 1,3 atm hoặc là dung dịch LMWβG/1%H_2O_2 được chiếu xạ ở các liều khác nhau trên nguồn gamma Co-60 tại trung tâm VINAGAMMA với liều xạ cho đến 20 kGy.

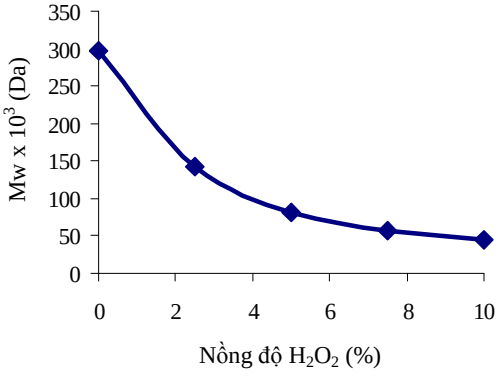
Xác định KLPT: KLPT của β-glucan được xác định trên máy sắc kí gel thấm qua (GPC) LC-20AB, với đầu dò RID-10A của hãng Shimadzu. Cột được sử dụng là cột ultrahydrogel 250 và 500 của hãng Water, Mỹ. Chất chuẩn được sử dụng là pullulant và dung môi sử dụng là nước với tốc độ dòng là 1ml/phút. Dung dịch mẫu β-glucan được tiêm vào cột ở nồng độ 0,3 %.

Nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh của LMWβG và oligoβ-glucan: Cá rô phi được nuôi trong 3 bể xi măng với số lượng 200 con trong mỗi bể. Bể 1, cá được cho ăn thức ăn không bổ sung LMWβG và oligoβ-glucan. Bể 2 và 3 cá được cho ăn thức ăn bổ sung tương ứng là LMWβG và oligoβ-glucan với hàm lượng 100 mg/kg thức ăn trong vòng 45 ngày. Sau đó 20 con cá được bắt ngẫu nhiên trong mỗi bể để gây nhiễm bệnh bằng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cá được theo dõi sau 21 ngày gây nhiễm và ghi nhận số lượng cá chết để tính phần trăm sống sót.

Nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh theo nồng độ oligoβ-glucan: Cá rô phi được cho ăn thức ăn có bổ sung oligoβ-glucan với hàm lượng khác nhau là: 0, 50, 100 và 150 mg/kg thức ăn trong vòng 45 ngày sau đó cá được gây nhiễm bằng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* như đã mô tả ở trên. Cá được theo dõi sau 21 ngày gây nhiễm và ghi nhận số lượng chết để tính phần trăm sống sót.

3. KẾT QUẢ BÀN LUẬN

3.1. Ảnh hưởng nồng độ H_2O_2 đến sự giảm KLPT của β-glucan



Hình 1. Sự giảm KLPT của β-glucan theo nồng độ H_2O_2.

Bột β-glucan được ngâm trương trong dung dịch H_2O_2 ở nồng độ 0; 2,5; 5,0; 7,5 và 10 % với tỉ lệ 1 : 6 (w/v) và hấp thủy nhiệt trong thời gian 30 phút để chế tạo LWMβG. Kết quả xác định KLPT (hình 1) cho thấy KLPT của β-glucan sau khi hấp giảm khi nồng độ H_2O_2 tăng. KLPT giảm từ 296.600 Da xuống 44.400 Da khi nồng độ H_2O_2 tăng từ 0 đến 10 %.

Bảng 1. KLPT (Mw, Mn) và chỉ số đa phân tán (PI = M_w/M_n) của LMWβG.

Nồng độ H_2O_2 (%)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Mw	296.600	141.600	81.600	58.000	44.400
Mn	141.200	71.000	44.700	34.100	28.600
PI	2,10	1,99	1,83	1,70	1,55

Kết quả trong bảng 1 cho thấy khi nồng độ H_2O_2 tăng thì giá trị PI giảm từ 2,60 đến giá trị nhỏ hơn (~1,55), chứng tỏ LMWβG có độ phân bố KLPT đồng nhất hơn. KLPT giảm nhanh khi nồng độ của H_2O_2 tăng từ 2,5 % đến 5,0 % và sau đó giảm chậm với sự gia tăng nồng độ lên đến 10 %. Có thể nhận thấy rằng nồng độ tối ưu của H_2O_2 sử dụng để cắt mạch KLPT β-glucan là trong khoảng 5 – 7 %.

Cơ chế của quá trình cắt mạch các polisaccarit nói chung và β-glucan nói riêng bằng H_2O_2 đã được nghiên cứu [13, 14]. Theo Quin et al (2002) [13] H_2O_2 có tính axít mạnh hơn nước với pKa = 11,6, do đó trong nước H_2O_2 phân li theo phương trình:

$$H_2O_2 \rightarrow H^+ + HOO^-$$

Anion HOO^- không bền và là nguyên nhân làm phân hủy H_2O_2. Nhiệt và môi trường kiềm sẽ làm gia tăng quá trình phân hủy H_2O_2. Anion HOO^- phản ứng với H_2O_2 để tạo ra gốc tự do $OH^{\bullet}$ có hoạt tính oxi hóa mạnh.

$$HOO^- \rightarrow OH^- + (O)$$

$$H_2O_2 + HOO^- \rightarrow {}^{\bullet}OH + O_2^{\bullet -} + H_2O$$

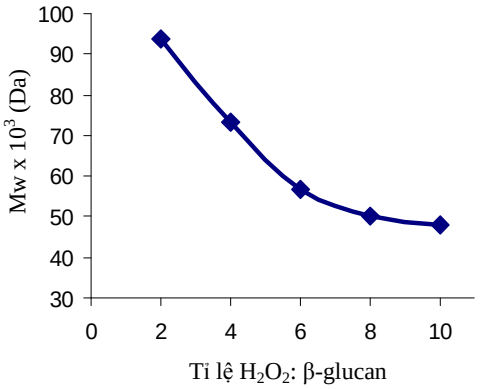
$$RH + HO^{\bullet} \rightarrow P^{\bullet} + H_2O$$

$$P^{\bullet}\ (\text{polime}) \rightarrow P^{\bullet}_1 + P_2$$

Theo von Sontag et al (1980) [14], các gốc tự do ${}^{\bullet}OH$ nhanh chóng tấn công cấu trúc cacborhydrat một các ngẫu nhiên không chọn lọc bằng cách bắt nguyên tử hidro của các nhóm C-H trên vòng glucozo và tạo thành các gốc tự do đại phân tử, sau đó quá trình mở vòng hoặc là đứt liên kết glucozit sẽ xảy ra do tác dụng của gốc tự do này.

3.2. Ảnh hưởng tỉ lệ H_2O_2 : β-glucan đến sự giảm KLPT của β-glucan

Ảnh hưởng của tỉ lệ dung dịch H_2O_2 : β-glucan đến quá trình cắt mạch của bột β-glucan được trình bày trên hình 2. Kết quả cho thấy với nồng độ H_2O_2 6 %, tỉ lệ dung dịch H_2O_2 : β-glucan ảnh hưởng đáng kể đến quá trình cắt mạch β-glucan. KLPT β-glucan giảm nhanh khi tỉ lệ dung dịch H_2O_2 : β-glucan tăng từ 2 : 1 đến 6 : 1 và giảm chậm khi tỉ lệ tăng lên 10 : 1.



Hình 2. Sự giảm KLPT của β-glucan theo tỉ lệ H_2O_2: β-glucan.

Bảng 2. KLPT (Mw, Mn) và chỉ số đa phân tán (PI) của các mẫu β-glucan sau khi hấp ở các tỉ lệ H_2O_2:β-glucan khác nhau.

Tỉ lệ dung dịch H_2O_2/ β-glucan (v/w)	2	4	6	8	10
Mw	93.900	73.200	56.700	50.100	47.900
Mn	51.700	42,600	35.100	31.300	30.300
PI	1,82	1,72	1,68	1,60	1,58

Sự thay đổi KLPT và độ đa phân tán của cung dịch β-glucan đạt được sau khi hấp được trình bày trong bảng 2. Kết quả cho thấy tỉ lệ dung dịch H_2O_2 : β-glucan khoảng 6 : 1 là tỉ lệ thích hợp để cắt mạch β-glucan chế tạo LMWβG.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian hấp đến sự giảm KLPT của β-glucan

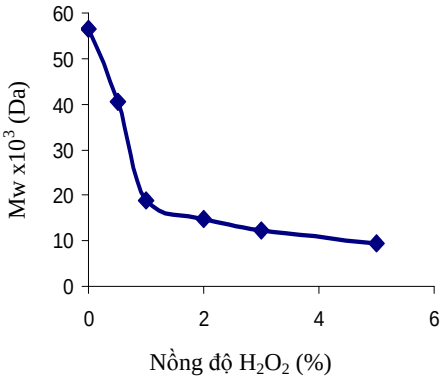
Bảng 3. KLPT (Mw, Mn) và chỉ số đa phân tán (PI) của các mẫu β-glucan sau khi hấp theo thời gian khác nhau.

Thời gian hấp (phút)	15	30	60
Mw	75.500	56.700	54.600
Mn	43.000	34,400	33.700
PI	1,71	1,65	1,62

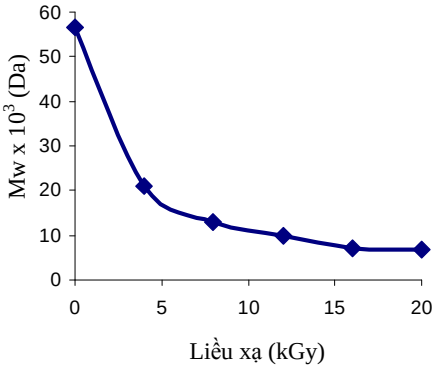
Bột β-glucan được ngâm trương trong dung dịch H_2O_2 6 % ở tỉ lệ H_2O_2 : β-glucan 6 : 1 (v/w) sau đó được hấp ở những khoảng thời gian khác nhau để nghiên cứu sự ảnh hưởng của thời gian hấp đến quá trình cắt mạch của β-glucan. Kết quả bảng 3 cho thấy khi tăng thời gian hấp KLPT của β-glucan giảm xuống 75.500, 56.700 và 54.600 tương ứng với thời gian hấp là 15,

30 và 60 phút. Từ kết quả này có thể chọn thời gian hấp là 30 phút để cắt mạch β-glucan với nồng độ H_2O_2 là 6 % và tỉ lệ H_2O_2 : β-glucan là 6 : 1.

3.4. Ảnh hưởng nồng độ H_2O_2 và liều xạ đến sự giảm KLPT của LMWβG



Hình 3. Sự giảm KLPT của dung dịch LMWβG theo nồng độ H_2O_2.



Hình 4. Sự giảm KLPT của dung dịch LMWβG theo liều xạ.

KLPT của LMWβG tiếp tục giảm khi hấp dung dịch LMWβG chứa H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau. Kết quả trên hình 3 cho thấy để chế tạo được oligoβ-glucan với KLPT khoảng 9.000 Da thì nồng độ H_2O_2 cần sử dụng là 5 %. Tuy nhiên ở nồng độ H_2O_2 cao bên cạnh cắt đứt liên kết glucozit thì có thể phá vỡ vòng glucozơ làm thay đổi tính chất hóa lí của β-glucan. Do vậy, hiệu ứng đồng vận kết hợp bức xạ với 1 % H_2O_2 được sử dụng cắt mạch LMWβG để chế tạo oligoβ-glucan [15, 16]. Kết quả sự giảm KLPT khi tăng liều xạ được thể hiện trong hình 4 cho thấy oligoβ-glucan nhận được trong khoảng liều xạ từ 12 đến 16 kGy. Kết quả tương tự cũng được công bố trong công trình của Byun et al (2008) [17], nhưng khoảng liều sử dụng là khá cao đến 50 kGy do không sử dụng H_2O_2.

3.5. Hiệu ứng kích kháng bệnh của LMWβG và oligoβ-glucan

Sau 21 ngày gây nhiễm bệnh, tỉ lệ cá chết ở các nghiệm thức được ghi nhận. Nghiệm thức ĐC1, cá chết với tỉ lệ trung bình là 10 %. Mẫu cấy phân lập cá chết không thấy có sự hiện diện của vi khuẩn gây nhiễm bệnh. Như vậy, cá chết ở nghiệm thức này có thể do sức khỏe cá yếu. Tỉ lệ chết của cá rô phi ở các nghiệm thức thí nghiệm được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Phần trăm sống sót của cá rô phi sau 21 ngày gây nhiễm bệnh với vi khuẩn Streptococcus agalactiae của các nghiệm thức thí nghiệm.

Nghiệm thức	ĐC1	ĐC2	NT1	NT2
Phần trăm sống sót (%)*	89,75 ± 5,00^{a}	44,67 ± 10,41^{cd}	61.25 ± 10,41^{bc}	76.75 ± 2,89^{ab}

*Giá trị cùng hàng giống nhau kí tự thì không khác nhau ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

ĐC1: Không bổ sung β-glucan, không gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

ĐC2: Không bổ sung β-glucan, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

NT1: Bổ sung LMWβG 100 mg/kg thức ăn, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

NT2: Bổ sung oligoβ-glucan 100 mg/kg thức ăn, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

Kết quả bảng 4 cho thấy nghiệm thức ĐC2 có phần trăm sóng sót của cá là 44,67 ± 10,41 thấp hơn so với nghiệm thức NT1 (61,25 ± 10,41) và NT2 (76,75 ± 2,89). Như vậy có thể thấy rằng Oligoβ-glucan có hiệu ứng kích kháng bệnh tốt hơn LMWβG.

Điều này có thể giải thích là do β-glucan chỉ có tác dụng kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu (nonspecific immunity). Miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào là hai quá trình quan trọng của miễn dịch không đặc hiệu đối với cá. Đối với miễn dịch dịch thể, β-glucan có tác dụng giúp tăng cường bổ thể (complement), interferon (IFN) và hoạt tính men lisozyme. Bổ thể là hệ thống protein trong huyết tương có vai trò tiêu diệt mầm bệnh khi xâm nhập vào cơ thể cá, Interferon là các glicoprotein do bạch cầu (T-limphocyte) sản xuất ra nhằm chống virus nhân bản và lây nhiễm sang tế bào của vi khuẩn, đặc biệt là một số vi khuẩn gram (+). Đối với miễn dịch tế bào, β-glucan có vai trò kích thích quá trình thực bào (phagocytosis) của tiểu thực bào (microphage) và đại thực bào (macrophage). Trong quá trình này, oxy được sử dụng để chuyển thành các anion oxy hóa mạnh như superoxide (O^{2-}) và nitrogen oxide (NO) có thể tiêu diệt vi khuẩn và virus [2, 4, 7]. Quá trình này cũng làm tăng hoạt tính men superoxide dismutase (SOD) và glutathione peroxidase (GPx) nhằm làm giảm ảnh hưởng xấu của các anion oxy hóa mạnh lên tế bào của cá.

3.6. Ảnh hưởng nồng độ oligoβ-glucan đến khả năng kích kháng bệnh của cá rô phi

Sau 21 ngày gây nhiễm bệnh, phần trăm cá sống sót ở các nghiệm thức được ghi nhận. Nghiệm thức ĐC1 với phần trăm sống sót là 89,67 ± 2,89 và mẫu cấy phân lập cá chết không thấy có sự hiện diện của vi khuẩn gây nhiễm thực nghiệm.

Bảng 5. Phần trăm sống sót của cá rô phi sau 21 ngày gây nhiễm bệnh với vi khuẩn Streptococcus agalactiae của các nghiệm thức thí nghiệm.

Nghiệm thức	ĐC1	ĐC2	NT1	NT2	NT3
Phần trăm sống sót (%)*	$89,67 \pm 2.89^{a}$	$49,43 \pm 10.41^{d}$	$63,33 \pm 5.77^{bc}$	$73,76 \pm 2.89^{ab}$	$76,00 \pm 5,00^{ab}$

*Giá trị cùng hàng giống nhau kí tự thì không khác nhau ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

ĐC1: Không bổ sung β-glucan, ngâm bằng nước muối sinh lí vô trùng.

ĐC2: Không bổ sung β-glucan, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

NT1: Bổ sung oligoβ-glucan 50 mg/kg thức ăn, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

NT2: Bổ sung oligoβ-glucan 100 mg/kg thức ăn, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

NT3: Bổ sung oligoβ-glucan 150 mg/kg thức ăn, gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae.*

Kết quả bảng 5 cho thấy khi nồng độ oligoβ-glucan tăng thì hiệu ứng kháng bệnh của cá tăng lên biểu hiện qua phần trăm sống sót tăng. Đối với mẫu không bổ sung oligoβ-glucan phần trăm sóng sót là 49,43 ± 10,41, với mẫu cá bổ sung hàm lượng 50 mg/kg thức ăn phần trăm sống tăng lên 63,33 ± 5,77 và đạt cao nhất ở hàm lượng 150 mg/kg thức ăn (76,00 ± 5,00).

4. KẾT LUẬN

LMWβG với KLPT khoảng 40.000 - 60.000 Da được chế tạo bằng phương pháp hấp thủy nhiệt β-glucan trương trong dung dịch H_2O_2 6 %, tỉ lệ H_2O_2:β-glucan là 6 : 1 (v/w) với thời gian hấp là 30 phút ở 125 ^{0}C. Oligoβ-glucan có KLPT trong khoảng 7000 - 9000 Da được chế tạo bằng cách chiếu xạ dung dịch LMWβG chứa 1 % H_2O_2 trong khoảng liều xạ 12 - 16 kGy. Hiệu ứng kích kháng bệnh của LWMβG và oligoβ-glucan đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy oligoβ-glucan có hiệu ứng kích kháng bệnh tốt hơn LMWβG. Hàm lượng oligoβ-glucann sử dụng như là chất kích kháng bệnh đối với cá rô phi trong khoảng 100 - 150 mg/kg thức ăn. Oligoβ-glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 rất có triển vọng ứng dụng làm chất kích kháng bệnh loại oligosacarit tự nhiên an toàn và hiệu quả đối với vật nuôi và cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yano T., Matsuyama H., Mangindaan R. E. P. - Polisaccharide-induceed protection of carp *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection, Journal of Fish Diseases **14** (1991) 577-582.
2. Robertsen B., Rorstad G., Engstad R., Raa J. - Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon Salmo salar L., by a glucan from Saccharomyces cerevisiae cell wall, Journal of Fish Diseases **13** (1990) 391–400.
3. Matsuyama H., Mangindaan R. E. P., Yano T. - Protective effect of Schizophyllan and Scleroglucan against Streptococcus sp. Infection in yellowtail (Seriola quinqueradiata), Aquaculture**101** (1992)197–203.
4. Jeney G., Anderson D. P. - Glucan injection or bath exposures given alone or in combination with bacterin enhance the non-specific defense mechanisms in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Aquaculture **116** (1993) 315–29.
5. Siwicki A. K., Anderson D. P., Rumsey G. L. - Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology Immunopathology **41** (1994) 125–39.
6. Yoshida T, Kruger R., Inglis V. - Augmentation of non-specific protection in African catfish, Clarias gariepinus (Burchell) by the long-term oral administration of immunostimulants, Journal of Fish Diseases **18** (1995) 195-198.
7. Ogier de Baulny M., Quentel C., Fournier V., Lamour F., Le G. R. - Effect of long term oral administration of β-glucan as in immunostimulant or an an adjiuvant on some non-specific parameters of the immune stimulation of turbot Scophthlmus maximus, Diseases of Aquatic Organisms **26** (1996) 139-147.
8. Mulero V., Esteban M. A., Munoz J., Meseguer J. - Dietary intake of levamisol enhances the immune stimulation and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata L*), Fish and Shellfish Immunology **8** (1998) 49-62.
9. Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schuep W., Hole R. - Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Fish and Shellfish Immunology **8** (1998) 409-424.
10. Nishmura K., Nishmura S., Nishi N., Saiki I., Tokura S., Azuma I. - Immunological activity of chitin and its derivaties, Vaccine **2** (1984) 93-98.

11. Azuma I., Jolles G. - Development of immunostimulants in Japan. In: Immunostimulants Now and Tomorrow, Jpn. Soc. Press, Tokyo, Springer Verlag, Berlin **20** (1987) 41-46.
12. Suphantharika M.., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C. - Preparation of spent brewer's yeast β-glucan with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, Bioresourse Technology **88** (2003) 55-60.
13. Quin C. Q., Du Y. M., Xiao L. - Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan, Polimer Degradation and Stability **76** (2002) 211-218.
14. von Sonntag C. - Free-radical reaction of carbohydrates as studied by radiation techniques. In R. Stuart Tipson, & Derek Horton (Eds), Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Acedamic Press **50** (1980) 7-77.
15. Duy N. N., Phu D. V., Anh N. T., Hien N. Q. - Synergistic degradation to prepare oligochitosan by γ-irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide, Radiation Physics and Chemistry **80** (2011) 848-853.
16. Hien N. Q., Phu D. V., Duy N. N., Lan N. T. - Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide, Carbohydrate Polimers **87** (2012) 935-938.
17. Byun E. H., Kim J. H., Sung N. Y. et al. - Effect of gamma irradiation on the physical and structure properties of β-glucan, Radiation Physics and Chemistry **77** (2008) 781-786.

ABSTRACT

STUDY ON EFFECT OF IMMUNE STIMULATION OF γ-RAY IRRADIATED β-GLUCAN ON TILAPIA

Nguyen Ngoc Duy, Dang Van Phu, Nguyen Quoc Hien

Research and Development Center for Radiation Technology, Vietnam Atomic Energy Institute 202A, Str. 11, Linh xuan Ward, Thu duc District, Ho Chi Minh City

Email: *ngocduy158@yahoo.com*

Low molecular weight β-glucan (LMWβG) and oligoβ-glucan solution were prepared by the hydrothermal steaming combination with γ-irradiation method. The efficiency of the degradation process was demonstrated by gel permeation chromatography (GPC) analysis of the average molecular weight (Mw) of β-glucan. Results showed that the Mw decreased with increasing steaming time, concentration of H_2O_2 and doses. For LMWβG, Mw reduced from 296,600 Da to 44,400 Da when concentration of H_2O_2 raises from 0 to 10 % and for oligoβ-glucan Mw reduced from 56,700 to 7,100 Da at 16 kGy. Tilapia fish was fed with LMWβ and oligoβ-glucan of 100 mg/kg feed for 45 days and then was challenged with *Streptococcus agalactiae* bacterial to investigate immune stimulation. The results indicated that oligoβ-glucan has higher immune stimulation effect compared to LMWβG. The effect of oligoβ-glucan with various concentrations of 50, 100 and 150 mg/kg feed was investigated. Results showed that the highest survival rate was attained for oligoβ-glucan of 150 mg/kg as feed additive.

Keywords: β-glucan, oligoβ-glucan, immune stimulation, gamma Co-60.