

SO SÁNH HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM MỐC CỦA CÁC LOẠI CHITOSAN CÓ NGUỒN GỐC KHÁC NHAU TRONG ĐIỀU KIỆN XỬ LÝ CHIẾU XẠ VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY KHÁC NHAU

NGUYỄN DUY LÂM

Viện Công nghệ sau thu hoạch

TRẦN BÀNG DIỆP

Viện Khoa học và Kỹ thuật hạt nhân

Việc sử dụng chitosan để làm màng bao cho bảo quản quả tươi được đánh giá là một hướng phát triển mới trong công nghệ sau thu hoạch của tương lai [2]. Loại polysaccharit này tự nó đã có khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây hỏng quả [3, 4, 8]. Các mẫu chitosan có nguồn gốc khác nhau có thể có hoạt tính ức chế vi sinh vật khác nhau. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có nghiên cứu nào đề cập tới hiệu ứng đó.

Hiện nay, phương pháp bọc màng chitosan vẫn chưa thể phát triển thành quy mô thương mại ở nhiều nước. Nguyên nhân là do hiệu quả kháng vi sinh vật của chitosan không đủ mạnh mà giá sản xuất lại cao so với các hóa chất trừ nấm tổng hợp. Để nâng cao hoạt tính kháng vi sinh vật của chitosan, một số tác giả đã sử dụng phương pháp chiếu xạ nhằm tạo ra các phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp. Nghiên cứu sớm nhất do Matsunashi và Kume [9] tiến hành, đã chỉ ra rằng chitosan chiếu xạ ở liều 100 kGy có khả năng ức chế cao nhất đối với sự phát triển của *Esherichia coli*. Các nghiên cứu gần đây của chúng tôi cũng thu được những kết quả tương tự đối với một số chủng vi khuẩn, nấm mốc và nấm men gây thối hỏng quả điển hình trong bảo quản sau thu hoạch [1, 5-7]. Do chiếu xạ ở trạng thái khô mà liều chiếu tối ưu tìm được trong các nghiên cứu nêu trên đều rất cao. Cần thiết phải tìm cách giảm liều chiếu để nâng cao tính khả thi của phương pháp về giá thành và về tính lành của màng bọc. Xử lý chiếu xạ chitosan ở trạng thái lỏng có thể đáp ứng được yêu cầu đó, nhưng vẫn chưa được đề cập trong các nghiên cứu trước đây.

Phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa rắn thường được sử dụng để đánh giá tác dụng kháng nấm mốc của chitosan, kể cả chitosan chiếu xạ [7, 11]. Trong vài nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã sử dụng phương pháp nuôi cấy nấm mốc trong môi trường lỏng và nhận thấy rằng vi sinh vật bị ức chế ở nồng độ chitosan rất thấp so với kết quả của các tác giả khác sử dụng môi trường nuôi cấy thạch đĩa [1, 5, 6]. Tuy nhiên, một nghiên cứu so sánh đầy đủ về độ nhạy của hai phương pháp nuôi cấy để đánh giá tác dụng của chitosan với cùng một điều kiện thí nghiệm vẫn chưa được tiến hành.

Vì những lý do nêu trên mà nội dung của nghiên cứu này nhằm so sánh hoạt tính kháng nấm mốc của các mẫu chitosan có nguồn gốc khác nhau và được xử lý chiếu xạ ở trạng thái khô và trạng thái lỏng. Hoạt tính cũng được đánh giá so sánh trên vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường rắn và lỏng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các mẫu chitosan và chủng vi sinh vật

Ba loại chitosan có nguồn gốc khác nhau nhưng đều được tách chiết từ vỏ tôm. Chúng đều có độ đề axetyl hóa 90% nhưng khác nhau về trọng lượng phân tử (TLPT) (\overline{M}_v): chitosan dạng bột ký hiệu 9B của hãng KATOKICHI (Nhật Bản) với $\overline{M}_v = 830.000$ D, chitosan dạng vảy ký hiệu No.1 do Phòng Công nghệ bức xạ - Viện nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt sản xuất với $\overline{M}_v = 280.000$ D, và chitosan dạng vảy ký hiệu No.2 do Phòng Polyme được phẩm - Viện Hóa

học cung cấp với $\overline{M}_v = 552.000$ D.

Các vi sinh vật được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của chitosan gồm 3 chủng nấm mốc: *Fusarium dimerum* Penzig, *Aspergillus fumigatus* Fresenius và *Aspergillus japonicus* Saito. Chúng tôi đã phân lập và phân loại các chủng này từ quả xoài và quả thanh long như đã nêu trong báo cáo trước [1, 5].

2. Xử lý chiếu xạ chitosan ở trạng thái khô và lỏng

Chitosan được xử lý tia gamma bằng nguồn Co-60 tại Trung tâm chiếu xạ Hà Nội và Viện nghiên cứu hóa học bức xạ Takasaki (Nhật Bản). Suất liều chiếu trung bình là 1,5 kGy/h với các mẫu xử lý ở Hà Nội và 10 kGy/h với các mẫu xử lý ở Takasaki. Khoảng liều chiếu xạ áp dụng là 50-500 kGy.

Khi chiếu xạ ở trạng thái lỏng, chitosan được pha với axit axêtic 5% thành dung dịch chitosan đặc 10% ở dạng như bột nhão. Các mẫu sau đó được đóng vào các túi PE và xử lý chiếu xạ ở các liều từ 2-40 kGy. Các mẫu lỏng được bảo quản lạnh sau khi chiếu xạ.

3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng vi sinh vật

Hoạt tính kháng vi sinh vật được đánh giá thông qua nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chitosan. Nuôi cấy trên môi trường rắn được thực hiện với môi trường PDA (Potato Dextro Agar) sử dụng các đĩa petri, trong khi để nuôi cấy lỏng đã sử dụng môi trường PDB (Potato Dextrose Broth của hãng Difco). Quy trình chi tiết đã được trình bày trong nghiên cứu trước [1, 5], theo đó dung dịch gốc chitosan chiếu xạ 1% trong axit axêtic 0,5% được pha vào môi trường để tạo các nồng độ khác nhau (pH=6). Các chủng thí nghiệm được cấy vào các bình tam giác 500 ml có chứa 100 ml môi trường PDB đã bổ sung chitosan ở các nồng độ thích hợp. Nuôi cấy lắc với tốc độ lắc 220 vòng/phút ở 28-30°C trong 96 giờ.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. So sánh hoạt tính kháng nấm mốc của chitosan nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa và trong môi trường lỏng

Nuôi cấy thạch đĩa sử dụng môi trường PDA còn nuôi cấy lỏng sử dụng môi trường PDB chứa chitosan cùng loại ở các nồng độ khác nhau. Chitosan No.2 là loại có \overline{M}_v ban đầu 552.000 D, sau khi chiếu xạ ở liều 60 kGy giảm xuống còn 170.000 D. Sự phát triển của các chủng nấm mốc được xác định thông qua sự tăng sinh khối trong môi trường lỏng hay đường kính của hệ sợi trên thạch đĩa. Kết quả xác định MIC của 3 chủng nấm mốc được nêu trong bảng 1. Sự phát triển của hệ sợi nấm được minh họa ở hình 1. Bảng 1 cho thấy MIC trên môi trường thạch đĩa lớn hơn hàng chục lần so với MIC trong môi trường lỏng. Chẳng hạn, để ức chế *F. dimerum* Penzig trong môi trường lỏng chỉ cần nồng độ 200 mg/l, trong khi nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa yêu cầu nồng độ chitosan 3.400 mg/l. Kết quả cũng tương tự đối với hai chủng *Aspergillus*. Như vậy, so sánh hai môi trường với nhau, chúng ta thấy sử dụng môi trường lỏng có độ nhạy cao hơn môi trường thạch đĩa. Phương pháp nuôi cấy lỏng rất được phổ biến để nuôi cấy vi khuẩn, còn đối với nấm mốc thì rất ít khi được sử dụng. Chúng tôi cho rằng sở dĩ môi trường lỏng có độ nhạy cao hơn là do tác động của chitosan tới vi sinh vật dễ được thực hiện hơn. Tác động của chitosan được duy trì thường xuyên ở nồng độ gần như không thay đổi trong suốt thời gian nuôi cấy. Đối với nuôi cấy trên thạch đĩa, hầu như không có sự dịch chuyển của chitosan trong toàn bộ thể tích nuôi cấy. Hệ sợi phát triển đến đâu thì có tác động của các phân chitosan tại nơi đó, trong khi chính lượng chitosan tại đó có thể bị suy giảm do tác động của chitinaza hay chitosanaza do vi sinh vật tiết ra để phân hủy chitosan. Giá trị MIC trên thạch đĩa thu được trong nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên cứu của các tác giả khác [8, 11]. Vì phương pháp nuôi cấy lỏng có độ nhạy cao hơn, nên trong các khảo sát tiếp theo, chúng tôi chỉ sử dụng phương pháp nuôi cấy này để phục vụ cho các đánh giá tác động của các tác nhân khác nhau.

2. So sánh hoạt tính kháng nấm mốc của các mẫu chitosan có nguồn gốc và trọng lượng phân tử (TLPT) ban đầu khác nhau

Để thực hiện nghiên cứu so sánh hoạt tính kháng vi sinh vật, thí nghiệm này chỉ sử dụng một chủng nấm mốc *F. dimerum* Penzig nuôi cấy trong môi trường lỏng. Kết quả xác định

MIC của các mẫu chitosan nguyên dạng (không chiếu xạ) và các mẫu chitosan chiếu xạ được trình bày trên hình 2. Giá trị MIC của các mẫu chitosan nguyên dạng No.1, No.2 và 9B lần lượt là 280, 320 và 280 mg/l. MIC của chitosan No.1 và 9B là bằng nhau (280 mg/l), trong khi chúng có \overline{M}_v rất khác nhau (280.000 và 830.000). Như vậy, MIC của các mẫu chitosan nguyên dạng có thể khác nhau nhưng sự khác biệt không quá lớn và không phụ thuộc vào TLPT của chúng.

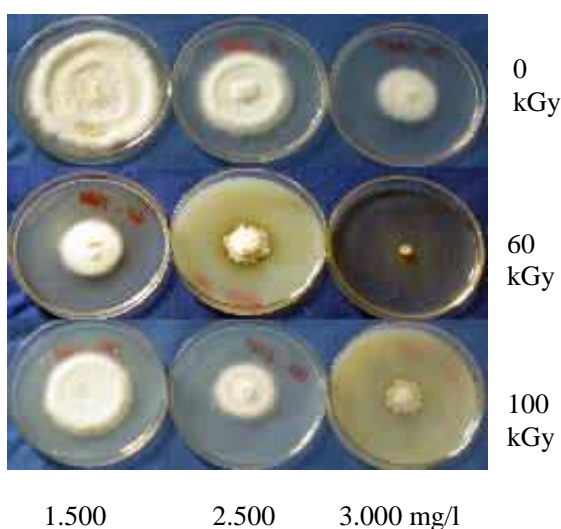
Khi xử lý chiếu xạ trong khoảng liều 25-200 kGy thì MIC bị thay đổi, nhưng sự thay đổi ở cả 3 loại chitosan đều có chung một quy luật, đó là đều tạo ra một cực tiểu về MIC hay nói một

cách khác là đều có một cực đại về hoạt tính kháng nấm xuất hiện tại một liều chiếu xạ nhất định. Điều đáng chú ý khác là giá trị cực tiểu MIC của 3 loại chitosan là khác nhau, cụ thể là 250, 210 và 220 mg/l tương ứng cho mẫu No.1, No.2 và 9B. Các cực tiểu MIC mặc dù đều xuất hiện trong khoảng liều hấp thụ 50-100 kGy, nhưng liều cần thiết cho chúng xuất hiện không giống nhau, phụ thuộc vào TLPT ban đầu. Để có MIC cực tiểu, dường như có một quy luật là nếu mẫu chitosan có TLPT ban đầu nhỏ hơn (chẳng hạn mẫu No.1) thì yêu cầu liều chiếu thấp hơn (50 kGy), còn mẫu có TLPT ban đầu lớn hơn (chẳng hạn mẫu No. 2 và 9B) thì yêu cầu liều chiếu cao hơn (tương ứng là 60 và 100 kGy).

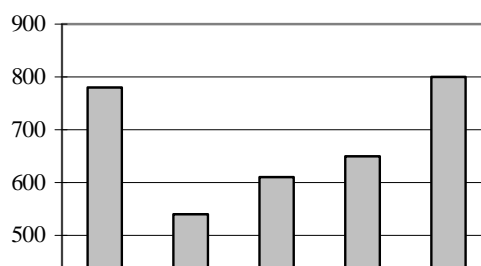
Bảng 1

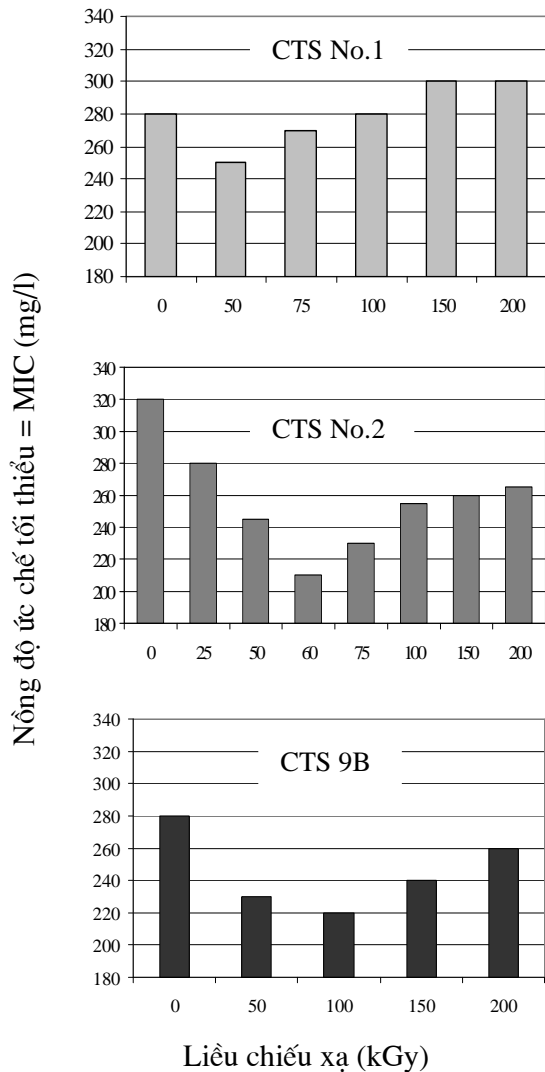
Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chitosan No.2 ($\overline{M}_v = 552.000$) chiếu xạ ở trạng thái khô được thử nghiệm trên nấm mốc nuôi cấy trên thạch đĩa và trong môi trường lỏng

Chủng nấm mốc	MIC của mẫu chitosan No.2 (mg/l)			
	Nuôi cấy thạch đĩa		Nuôi cấy lỏng	
	Không chiếu xạ	Chiếu xạ 60 kGy	Không chiếu xạ	Chiếu xạ 60 kGy
<i>Fusarium dimerum</i> Penzig	3.400	2.800	200	150
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	3.000	2.500	150	120
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	3.000	2.500	120	80



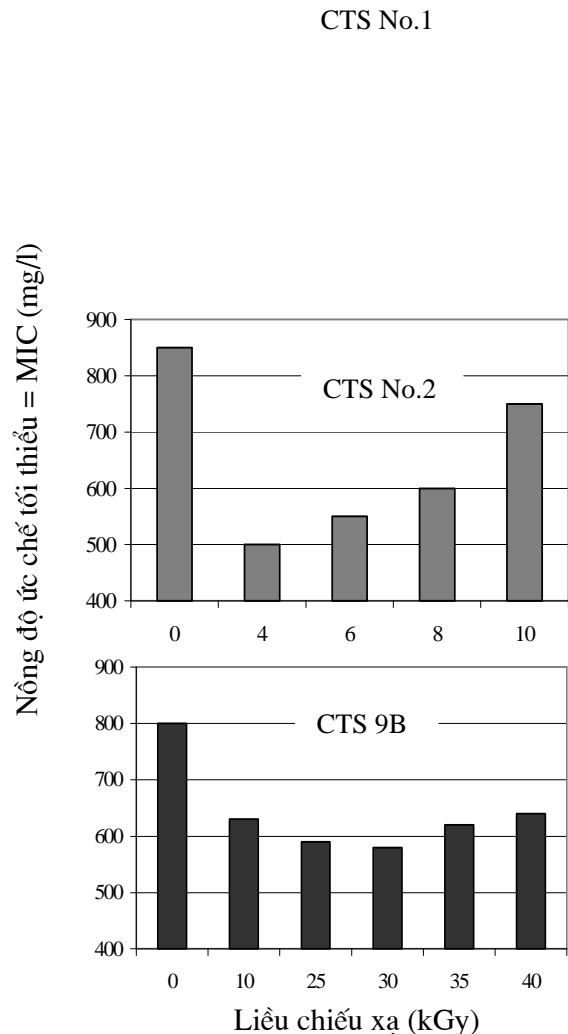
Hình 1. Tác dụng của chitosan được xử lý chiếu xạ ở trạng thái khô tới sự phát triển của hệ sợi nấm *F. dimerum* Penzig nuôi cấy trên thạch đĩa (trái) và trong môi trường lỏng (trên)





Hình 2. Sự thay đổi nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chitosan No.1 (hình trên), No.2 (hình giữa) và chitosan 9B (hình dưới) chiếu xạ ở trạng thái khô đối với sự phát triển của *Fusarium dimerum* Penzig

Kết quả ở hình 2 còn cho thấy sự tăng MIC xuất hiện ở mẫu No.1 khi chiếu xạ ở liều lớn hơn 150 kGy. Hiệu ứng này có thể liên quan đến sự phân hủy mạch chitosan khi bị chiếu xạ liều cao, làm hình thành những phân đoạn TLPT thấp ở dạng mono- hay oligom có hoạt tính kích thích vi sinh vật phát triển [9, 10, 12]. Hiện tượng này có thể hiểu được vì chitosan từ lâu đã được biết đến như là một chất tăng trưởng thực vật. Hiệu ứng nêu trên chỉ xuất hiện ở mẫu No.1, mà không xuất hiện ở mẫu No.2 và 9B khi



Hình 3. Sự thay đổi nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chitosan No.1 (hình trên), No.2 (hình giữa) và chitosan 9B (hình dưới) chiếu xạ ở trạng thái lỏng đối với sự phát triển của *Fusarium dimerum* Penzig

cùng được chiếu xạ ở liều trên 150 kGy; có thể do mẫu No.1 ngay từ lúc chưa chiếu xạ đã có TLPT khá nhỏ so với hai mẫu còn lại.

3. So sánh hoạt tính kháng nấm mốc của các mẫu chitosan được chiếu xạ ở trạng thái khô và trạng thái lỏng

Các kết quả ở phần trên đã chỉ ra rằng chiếu xạ ở trạng thái khô đã làm tăng hoạt tính kháng vi sinh vật của chitosan. Tuy nhiên, liều chiếu xạ cần thiết để tạo ra hiệu quả kháng vi sinh vật cao nhất là 50-100 kGy. Đây là liều khá cao, có

thể ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế cho ứng dụng của công nghệ về sau. Trong phần này chúng tôi nghiên cứu hoạt tính kháng vi sinh vật của các mẫu chitosan chiếu xạ ở trạng thái lỏng và so sánh hiệu quả đó với xử lý ở trạng thái khô đã thực hiện ở phần trên. Để thực hiện khảo sát này, các mẫu chitosan dạng “bột nhão” được tạo ra bằng cách pha chitosan 10% trong axit axêtic 5%. Sau đó, đem chiếu xạ ở liều 4-10 kGy đối với mẫu chitosan No.1 và No. 2, 10-40 kGy đối với mẫu 9B. Kết quả xác định MIC thực hiện đối với *Fusarium dimerum* Penzig được nêu trên hình 3.

Sự thay đổi MIC theo liều chiếu xạ của cả 3 mẫu chitosan xử lý ở trạng thái lỏng đều xuất hiện một MIC cực tiểu. Giá trị này là 540 mg/l đạt được khi chiếu xạ mẫu No.1 ở liều 4 kGy, là 500mg/l đối với mẫu No.2 ở liều 4 kGy và là 580 mg/l đạt được khi chiếu xạ mẫu 9B ở liều 25-30 kGy. Rõ ràng là MIC cực tiểu của ba mẫu chitosan khi chiếu xạ lỏng cũng khác nhau và được xuất hiện ở liều chiếu xạ cũng khác nhau. Điều này hoàn toàn tương tự như khi xử lý chiếu xạ ở trạng thái khô đã trình bày ở phần trên.

Như vậy, xử lý chiếu xạ chitosan ở trạng thái “bột nhão” cũng tạo ra sự thay đổi hoạt tính kháng vi sinh vật theo xu hướng như xử lý ở trạng thái khô, tức là tạo ra một cực đại về hoạt tính đó. Liều chiếu xạ để tạo ra cực đại đó khi xử lý ở trạng thái “bột nhão” thấp hơn hẳn so với khi xử lý ở trạng thái khô (nhỏ hơn 4-12 lần). Tuy nhiên, do cách chuẩn bị trạng thái “bột nhão” với axit axêtic nồng độ cao vì một lý do chưa xác định được đã làm giảm hoạt tính của chitosan tới mức mà ngay cả khi đạt được giá trị cực đại, hoạt tính đó vẫn nhỏ hơn mẫu chitosan khô trước khi chiếu xạ. Trong thời gian tới, cần làm rõ nguyên nhân của việc thay đổi hoạt tính kháng vi sinh vật khi chitosan chuyển sang trạng thái lỏng.

III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng phương pháp nuôi cấy lỏng để đánh giá hoạt tính kháng nấm mốc của chitosan có độ nhay cao hơn hàng chục lần so với phương pháp nuôi cấy trên thạch đĩa.

2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các mẫu chitosan có nguồn gốc khác nhau đối với *Fusarium dimerum* Penzig nằm trong khoảng

280-320 mg/l, không phụ thuộc vào nguồn gốc và trọng lượng phân tử ban đầu.

3. Xử lý chiếu xạ chitosan ở trạng thái khô và ở trạng thái lỏng đều tạo ra một cực đại về hoạt tính ức chế vi sinh vật. Hơn nữa, khi chiếu xạ ở trạng thái lỏng thì liều chiếu xạ yêu cầu để tạo ra hoạt tính cực đại thấp hơn hẳn so với khi chiếu xạ ở dạng khô.

4. Để tạo được hoạt tính kháng nấm mốc cực đại thì chitosan có TLPT ban đầu nhỏ hơn cần liều chiếu xạ thấp hơn, còn mẫu chitosan có TLPT ban đầu lớn hơn yêu cầu liều chiếu xạ cao hơn. Điều này đúng cho cả hai trường hợp chiếu xạ chitosan ở trạng thái khô và trạng thái lỏng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Diep T. B. et al.**, 2001: Proceedings of the Takasaki Symposium on Radiation Processing of Natural Polymers, Takasaki, Japan, 23-24 Nov, 2000, JAERI-Conf. 2001-005: 17-26.
2. **Edwind B.**, 1996: Edible Films and Coatings. New York, John Wiley and Sons.
3. **El Ghaouth A. et al.**, 1992: Phytopathology, 82: 398-402.
4. **Kendra D. F., Hadwiger L. A.**, 1994: Experimental Mycology, 8: 276-281.
5. **Nguyễn Duy Lâm và cs.**, 2000: Di truyền học và Ứng dụng, 3: 21-25.
6. **Lam N. D. et al.**, 2002: Proceedings of the Takasaki Symposium on Radiation Processing of Natural Polymers in Asia, Takasaki, Japan, 1-2 Oct, 2001, JAERI-Conf. 2002-003: 117-130.
7. **Lan K. N. et al.**, 2000: Japanese Food Irradiation, 35: 40-43.
8. **Li H., Yu T.**, 2000: J. Sci. of Food Agric., 81: 269-274.
9. **Matsubishi S., Kume T.**, 1997: J. Sci. Food Agric., 73: 237-241.
10. **Tokura S. et al.**, 1997: Macromolecular Symposia, 120: 1-9.
11. **Tsay C. F., Lin W. Y., Li C. F.**, 1993: J. of Biomass Energy Soc. of China, 12: 74-88.

12. Ulansky P., Rosiak J., 1992: Rad. Phys. Chem., 39: 53-57.

COMPARATIVE STUDY ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN OF VARIOUS ORIGINS TESTED IN DIFFERENT CONDITIONS OF RADIATION TREATMENT AND CULTURE MEDIUMS

NGUYEN DUY LAM, TRAN BANG DIEP

SUMMARY

The antifungal activity of three chitosan samples varied in the molecular weights (280,000, 552,000 and 830,000 D) and in the origins of production (Vietnam and Japan) were studied against *Fusarium dimerium* Penzig. The liquid and agar-plate mediums were formulated for evaluating the minimal inhibitory concentration (MIC) and the sensitivity of culture method. For antifungal activity enhancement, chitosan samples were irradiated with gamma rays in solid and paste-like conditions. Results showed that the MIC of chitosan samples tested in liquid medium was above ten times smaller than that of chitosan samples tested on agar-plates. So the method using liquid medium had higher sensitivity than the agar-plate method. MICs of native chitosan samples using liquid medium ranged from 280 to 320 mg/L were independent on their molecular weight (MW). The radiation treatment in solid and paste-like conditions had improved the chitosan antifungal activity. In addition, there was a maximal activity appeared for each of chitosan samples that has been irradiated in any condition. For enhancement of maximal antifungal activity, the solid-state radiation treatment required dose of 50-100 kGy, while a lower range of doses could be used in case of treatment in paste-like state. Further more, the optimal radiation dose for maximal antifungal activity enhancement was recorded as the initial MW dependent: the higher MW of the initial chitosan required higher dose.

Ngày nhận bài: 22-7-2002