Tạp chí Khoa học và Công nghệ **53** *(4) (2015) 457-468*

DOI: 10.15625/0866-708X/53/4/4642

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ KHẢO SÁT HIỆU ỨNG KÍCH KHÁNG BỆNH GAN THẬN MỦ TRÊN CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS*) CỦA OLIGOCHITOSAN VÀ OLIGOβ-GLUCAN

Nguyễn Ngọc Duy[1,*], Đặng Văn Phú[1], Lê Anh Quốc[1], Nguyễn Thị Kim Lan[1], Nguyễn Quốc Hiến[1], Phạm Đình Dũng[2], Phạm Duy Hải[3], Nguyễn Văn Nguyện[3]

[1]*Trung tâm Nghiên Cứu và Triển khai Công nghệ Bức Xạ, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam*
202A, Đường 11, P. Linh Xuân, Q. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh

[2]*Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nông nghiệp Công nghệ cao, Củ Chi, Tp. Hồ Chí Minh*

[3]*Trung tâm Công nghệ sau thu hoạch, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II*
116 Nguyễn Đình Chiểu, Quận 1, Tp. Hồ Chí Minh

[*]Email: *ngocduy158@yahoo.com*

Đến Toà soạn: 28/8/2014; Chấp nhận đăng: 30/5/2015

TÓM TẮT

Oligoβ-glucan và oligochitosan được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ dung dịch β-glucan và chitosan trong dung dịch chứa H_2O_2. Ảnh hưởng quá trình cắt mạch đến sự thay đổi khối lượng phân tử (KLPT) được xác định bằng sắc kí gel thấm qua (GPC). Kết quả thu được cho thấy KLPT của oligoβ-glucan và oligochitosan giảm khi tăng liều xạ và nồng độ H_2O_2. Đối với oligoβ-glucan, KLPT giảm từ 56,7 kDa xuống còn 7,1 kDa khi chiếu xạ dung dịch β-glucan 10%/H_2O_2 1 % tại liều xạ 14 kGy. Đối với oligochitosan KLPT giảm từ 45,5 kDa xuống 5,0 kDa khi chiếu xạ dung dịch chitosan 5%/H_2O_2 0,5 % tại liều xạ 21 kGy. Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus)* được cho ăn thức ăn có bổ sung oligoβ-glucan và oligochitosan ở các nồng độ 50, 100 và 200 mg/kg thức ăn trong vòng 45 ngày và sau đó được gây nhiễm bệnh với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* để khảo sát hiệu ứng kich kháng bệnh gan thận mủ. Kết quả cho thấy oligoβ-glucan và oligochitosan đều có hiệu ứng kích kháng bệnh tốt ở nồng độ thích hợp là khoảng 100 mg/kg

Từ khóa: oligoβ-glucan, oligochitosan, kích kháng bệnh, tra catfish

1. MỞ ĐẦU

Ngày nay, nuôi trồng thủy sản đã được xác định là một trong những ngành kinh tế mũi nhọn của nước ta. Nhiều đối tượng có giá trị được đưa vào nuôi với nhiều hình thức nuôi khác nhau, trong đó nghề nuôi cá tra ở đồng bằng sông Cửu Long đang trên đà phát triển [1]. Hiện nay, việc nuôi thâm canh cá tra ngày càng tăng và không có quy hoạch dẫn đến thiệt hại do dịch bệnh ngày càng cao. Bệnh gan thận mủ (còn gọi là bệnh mủ gan) là

bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra. Đây là bệnh gây thiệt hại lớn cho người nuôi cá tra thâm canh ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Bệnh gan thận mủ thường khó được phát hiện sớm do cá bệnh ít có biểu hiện bên ngoài vì vậy tỉ lệ cá chết khi bị nhiễm bệnh có thể lên đến 90 %.

Trong bối cảnh hội nhập hiện nay, thế giới đang rất quan tâm đến việc sản xuất và tiêu thụ các sản phẩm sạch. Những sản phẩm đáp ứng được điều này đang dần chiếm lĩnh thị trường quốc tế với giá trị gia tăng. Do vậy, rất cần có một chiến lược quản lí hiệu quả sức khỏe vật nuôi như chẩn đoán bệnh nhanh, cải thiện sức khỏe vật nuôi bằng cách đảm bảo môi trường sống thích hợp và tăng cường sức đề kháng cho đối tượng nuôi [2].

Sử dụng các chế phẩm sinh học, hạn chế sử dụng kháng sinh để phòng và trị bệnh cho vật nuôi trong nuôi thủy sản là những hướng nghiên cứu và ứng dụng đang được quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Ngày nay, các hoạt chất sinh học nhằm kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu được sử dụng trong thức ăn thủy sản ngày càng phổ biến, đặc biệt là các chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc từ tự nhiên như levamisol, β-glucan, peptidoglycan, chitin, chitosan,.. cũng như một vài dẫn xuất khác có nguồn gốc từ thực vật và động vật [3-5].

Chitosan và β-glucan là những polysaccarit tự nhiên, thân thiện môi trường có nguồn gốc từ động vật và thực vật. Trong khi, chitosan là một polyme mạch thẳng được cấu tạo từ các D-glucosamin liên kết theo kiểu β-(1→ 4)-2-acetamido-2-deoxy–D–glucose, là sản phẩm của quá trình deacetyl hóa chitin, có khả năng tự phân hủy sinh học kháng khuẩn, kháng nấm, tương hợp sinh học, làm lành vết thương,.. [8, 9] thì β-glcan được thu nhận từ thành tế bào của nấm men (*Sacchromyces cerevisiae*), vỏ cám của hạt yến mạch và lúa mạch [4 - 7]. Các nguồn khác bao gồm tảo biển, và một số loài nấm như Reishi, Shiitake và Maitake,.. [10]. Cả chitosan và β-glucan đều được biết đến như là chất bổ sung sinh học nhờ vào khả năng kích thích hệ thống kháng thể, giúp tăng cường hoạt động của các đại thực bào và kích thích tăng tiết nhiều cytokin (chất hoạt hóa tế bào) nhằm tiêu diệt các mầm bệnh xâm nhập từ bên ngoài, kích thích tiêu hóa, phòng các bệnh đường ruột, nhiễm trùng do vi khuẩn, vi rút,.. và đặc biệt sử dụng chitosan và β-glucan cắt mạch bổ sung vào thức ăn trong chăn nuôi sẽ gia tăng hiệu ứng kháng bệnh và tăng cường hệ miễn dịch cho vật nuôi [3 - 7].

Ứng dụng chitosan và β-glucan trong các lĩnh vực khác nhau đã được thực hiện bởi nhiều nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên, việc nghiên cứu chế tạo và bổ sung oligochitosan và oligoβ-glucan vào thức ăn cho vật nuôi trong nuôi trồng thủy sản vẫn là vấn đề mới và được nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới. Mục đích của nghiên cứu này là chế tạo oligochitosan, oligoβ-glucan và nghiên cứu khả năng kích kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu hóa chất

Chitosan là sản phẩm trong nước có khối lượng phân tử (KLPT) Mw ~ 110 kDa, độ deacetyl (ĐĐA) ~ 93 %. Oligoβ-glucan Mw ~ 7,1 kDa được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ dung dịch β-glucan 10%/H_2O_2 1 % tại liều xạ 14 kGy như đã mô tả trong công trình trước đây [11]. Bã men bia (*Saccharomyces uvarum*) được mua từ nhà máy bia Sài gòn. Hydrogen peroxit, axit lactic là sản phẩm của hãng Merk, Đức. Cá tra (*Pagasianodon hypophthalmus*) được mua từ Trung tâm giống Quốc gia Thủy sản Nước ngọt Nam bộ. Cá có kích cỡ đồng đều, khỏe mạnh,

không trầy xước, không dị hình, trọng lượng trung bình từ 17 – 20 g/con. Chủng vi khuẩn gây bệnh là chủng *Edwardsiella ictaluri* Gly 09M (*E. ictaluri*) nhận từ Trung tâm Quốc gia Quan trắc Cảnh báo Môi trường và Phòng ngừa Dịch bệnh Thủy sản Khu vực Nam bộ, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, Tp. Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chế tạo oligochitosan

Ngâm chitosan trong dung dịch H_2O_2 với các nồng độ là 0,5; 1,0 và 2 % theo tỉ lệ 1 gam chitosan : 20 ml dung dịch trong 24 giờ [12]. Sau đó lọc hỗn hợp qua vải, thu hồi và rửa chitosan nhiều lần trong nước cất để loại bỏ H_2O_2.

Sau khi ngâm trương chitosan trong dung dịch H_2O_2 1 và 2 % trong 24 giờ, thêm acid lactic với nồng độ 2 % (w/v) và khuấy đều trong 2 giờ để hòa tan hoàn toàn chitosan. Lọc dung dịch chitosan qua lưới thép không gỉ 100 mesh. Thêm H_2O_2 và nước cất vào dung dịch vừa lọc để đạt nồng độ dung dịch chitosan 5 % (w/v) và H_2O_2 là 0,5 % (w/v) . Đưa dung dịch chitosan/H_2O_2 vào lọ thủy tinh có nút vặn kín khí và chiếu xạ trên nguồn gamma SVST Co-60/B tại Trung tâm VINAGAMMA, Tp. HCM theo các liều xạ cho đến 21 kGy.

2.2.2. Xác định KLPT của oligochitosan

KLPT M_w được đo trên máy máy sắc kí gel thấm qua (GPC) LC-20AB, với đầu dò RID-10A, Shimadzu. Cột sử dụng là cột ultrahydrogel 250 và 500 của hãng Water, Mỹ. Chất chuẩn được sử dụng là pullulant có KLPT 780 – 380.000Da. Dung môi sử dụng là hỗn hợp 0,25 M CH_3COOH/ 0,25 M CH_3COONa với tốc độ dòng là 1 ml/phút, nhiệt độ cột là 40 °C. Mẫu được tiêm vào cột ở nồng độ 0,3 %.

2.2.3. Phổ hồng ngoại của oligochitosan

Phổ hồng ngoại của oligochitosan được đo trên máy FTIR- 8400S, Shimadzu, với kĩ thuật ép viên KBr. Độ đề acetyl của chiotsan được xác định bằng công thức: ĐĐA, % = 100 – ([A_{1320}/A_{1420} – 0,3822]/0,03133) [13]. Trong đó A_{1320} và A_{1420} là mật độ quang tương ứng tại các đỉnh 1320 cm^{-1} và 1420 cm^{-1}.

2.2.4. Nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh gan thận mủ của oligochitosan và oligoß-glucan

Chuẩn bị thức ăn cho thí nghiệm

Thức ăn tổng hợp có các thành phần chính bao gồm: Protein thô 28,99 %, béo thô 6,81 %, chất xơ 5,1 %, đô tro 8,93 %, độ ẩm 6,7% được sử dụng làm thức ăn cho cá thí nghiệm. Các dung dịch oligosaccarit nồng độ 5% được phun và trộn cho đều vào thức ăn theo các nồng độ 50, 100 và 200 ppm. Sau đó thức ăn được phủ một lớp dầu mực, để khô tự nhiên khoảng 15 phút. Thức ăn thí nghiệm được giữ trong tủ lạnh 4 °C và sử dụng trong vòng 3 ngày. Cho cá ăn trong 45 ngày sau đó tiến hành gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*.

Phương pháp gây nhiễm bệnh

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* bảo quản ở -80 ^{0}C, được cấy chuyền sang đĩa thạch BA và ủ ở 28 ^{0}C trong 28 - 32 giờ để tạo giống cấp một. Chọn khuẩn lạc *E.ictaluri* trên đĩa BA huyền phù trong môi trường BHI broth 5 ml nuôi cấy lắc qua đêm ở 28 ^{0}C. Tiến hành lên men dịch vi khuẩn này với thể tích 5 lít môi trường BHI broth (đã được hấp khử trùng 121 C trong 15 phút). Các thông số lên men là: nhiệt độ 28 ^{0}C, pH = 7, sục khí, khấy 200 vòng/phút, thời gian lên men 24 – 36 giờ. Đo OD ở bước sóng 600 nm và xác định mật độ vi khuẩn thông qua đường chuẩn. Từ đó điều chỉnh mật độ vi khuẩn *E. ictaluri* thích hợp để tiến hành cảm nhiễm cho cá tra ở các nghiệm thức sau 45 ngày tại liều 3.10^3 CFU/cá. Cá thí nghiệm được tiêm xoang bụng 0,2 ml (3×10^3 CFU) dịch khuẩn *E. ictaluri* ở các nghiệm thức cho ăn thức ăn thí nghiệm và nghiệm thức (NT) đối chứng dương. NT đối chứng âm tiêm nước muối sinh lí 0,85 % NaCl.

Bố trí thí nghiệm

Bể kính được vệ sinh kĩ bằng xà phòng và chlorin 200 ppm, phơi khô. Sau đó cấp nước vào bể, có sục khí. Bể kính dùng để thí nghiệm cấp khoảng 60 - 80 L nước, mỗi bể chứa 15 - 20 con. Bể được đặt trong phòng thí nghiệm thoáng khí.

+ Thí nghiệm khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ của oligochitosan bao gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, kí hiệu như sau:

- ĐC (-): (không bổ sung oligochitosan) không gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- ĐC (+): (không bổ sungoligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 1 (bổ sung 50 mg/kgoligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 2 (bổ sung 100 mg/kg oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 3 (bổ sung 200 mg/kg oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri.*

+ Thí nghiệm khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ của oligoβ-glucan cũng bao gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, kí hiệu như sau:

- ĐC (-): (không bổ sung oligoβ-glucan) không gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- ĐC (+): (không bổ sung oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 4 (bổ sung 50 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 5 (bổ sung 100 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri,*
- NT 6 (bổ sung 200 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri.*

Cá được cho ăn thoả mãn (3 % khối lượng cơ thể), cho ăn 2 lần/ngày và kéo dài trong 45 ngày và 3 ngày thay nước 1 lần, mỗi lần thay 30 %. Sau đó tiến hành gây nhiễm thực nghiệm với *E. ictaluri* bằng phương pháp tiêm. Đếm số cá chết hàng ngày trong mỗi bể và thu mẫu cá vừa chết kiểm tra vi khuẩn gây bệnh trong thận và gan. Cá trong các NT sẽ được theo dõi trong 21 ngày liên tục và ghi nhận tổng số lượng cá chết. Từ đó xác định được NT nào có tỉ lệ sống cao và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn so với NT đối chứng. Xác định tỉ lệ sống (TLS) theo công thức sau:

$$TLS\,(\%) = \frac{\text{Số cá còn lại}}{\text{Số cá thả nuôi}} \times 100$$

Số liệu được xử lí thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0. Multiple comparation (Tukey's) được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Mức khác biệt có ý nghĩa thống kê được đề nghị là $p < 0,05$. Số liệu phần trăm được chuẩn hóa bằng hàm Arcsin. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Exel phiên bản 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chế tạo oligochitosan

Trong công trình trước đây chúng tôi đã nghiên cứu chế tạo chitosan KLPT thấp bằng phương pháp chiếu xạ chitosan dạng trương bão hòa trong dung dịch H_2O_2 để sản xuất chitosan KLPT thấp dạng bột khô [14]. Trong công trình này, oligochitosan được chế tạo từ chitosan KLPT thấp nhưng không sử dụng phương pháp chiếu xạ chitosan dạng trương trong H_2O_2 mà cắt mạch dị thể bột chitosan trong dung dịch H_2O_2 trước, sau đó hòa tan bằng axit lactic và tiếp tục cắt mạch dung dịch chitosan/H_2O_2 bằng phương pháp chiếu xạ để chế tạo oligochitosan.

Kết quả Bảng 1 cho thấy KLPT của chitosan giảm khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,5 đến 2 %. Cụ thể, khi ngâm chitosan trong dung dịch H_2O_2 ở nồng 0,5 % sau 24 giờ, KLPT của chitosan giảm từ 110,4 xuống còn 66,6 kDa. Khi tăng nồng độ dung dịch H_2O_2 lên 1 và 2 %, hiệu quả cắt mạch dị thể tăng lên, KLPT của chitosan giảm xuống tương ứng là 45,5 và 35,2 kDa. Kết quả này cho thấy nồng độ H_2O_2 ảnh hưởng đáng kể tới tốc độ cắt mạch và sự hiệu quả khi dùng H_2O_2 để cắt mạch chitosan. Bên cạnh việc H_2O_2 tấn công, cắt đứt liên kết glycosid làm giảm KLPT của chitosan thì cũng làm giảm ĐĐA của chitosan [15]. Do đó trong nghiên cứu này nồng độ H_2O_2 được sử dụng tối đa là 2 % để hạn chế sự giảm ĐĐA cũng như quá trình biến đổi cấu trúc của chitosan. Khoảng nồng độ của H_2O_2 từ 0,5 - 2 % cũng được Qin et al. [16] và Feng et al. [17] khuyến cáo và áp dụng trong các công trình nghiên cứu cắt mạch chitosan.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ H_2O_2 đến KLPT và ĐĐA% của chitosan ngâm trương trong H_2O_2.

M_w của CTS ban đầu (kDa)	PI của CTS ban đầu	ĐĐA% của CTS ban đầu	Mẫu	M_w của CTS sau khi ngâm H_2O_2 (kDa)	PI của CTS sau khi ngâm H_2O_2	ĐĐA của CTS sau khi ngâm H_2O_2 (%)
110,4	1,71	93,2	CTS/0,5%H_2O_2	66,6	2,97	91,8
			CTS/1%H_2O_2	45,5	3,37	90,9
			CTS/2%H_2O_2	35,3	3,44	87,9

Cơ chế của quá trình cắt mạch các polysaccarit bằng H_2O_2 đã được quan tâm nghiên cứu và đã có nhiều công trình được công bố. Theo Quin et al. [16], H_2O_2 có pKa = 11,6 do đó trong nước phân li theo phương trình:

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

Anion HOO^- không bền và là nguyên nhân làm giảm sự bền vững của H_2O_2. Nhiệt và môi trường kiềm sẽ làm gia tăng quá trình phân hủy của 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 [16].

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

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

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

$$P^{\bullet} \longrightarrow P^{\bullet}_1 + P_2$$

Theo Von Sontag et al. [18], các gốc tự do ${}^{\bullet}OH$ nhanh chóng tấn công mạch cacbohydrat một các ngẫu nhiên không chọn lọc bằng cách bắt nguyên tử hidro của các nhóm R-C-H và tạo thành các gốc tự do đại phân tử R-C$^{\bullet}$, quá trình chuyển vị các gốc tự do này làm đứt liên kết glucozit tạo ra cacbohydrat có KLPT nhỏ hơn.

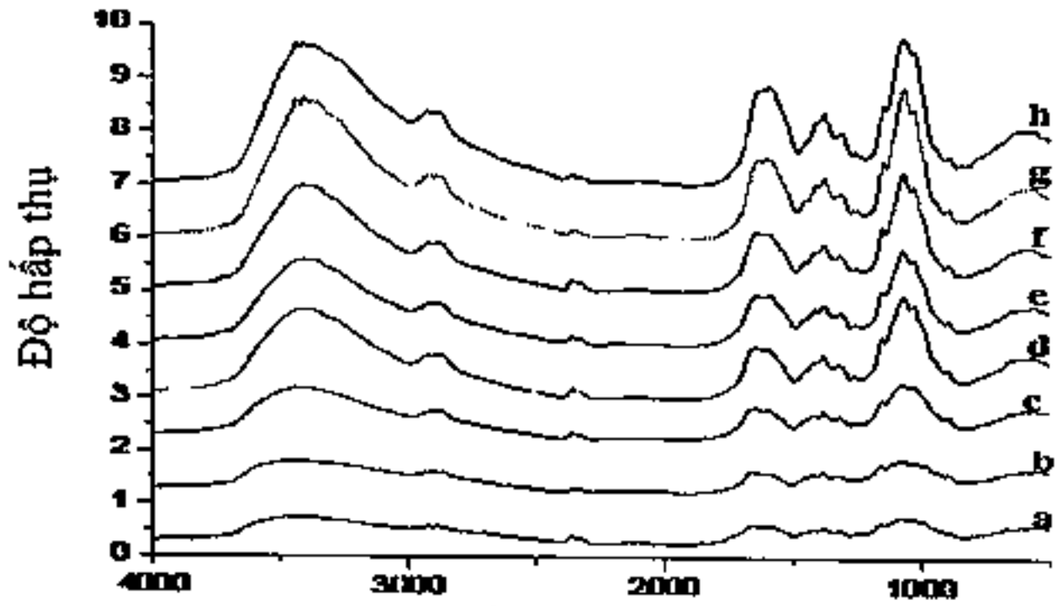
Trên cơ sở kết quả nghiên cứu cắt mạch dung dịch chitosan tạo oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp cắt mạch với H_2O_2 trước đây của chúng tôi [19, 20], nồng độ H_2O_2 0,5 % được lựa chọn để cắt mạch dung dịch chitosan 4 % (mẫu chitosan đã được xử lí cắt mạch dị thể trước với H_2O_2 1 và 2 %)

Bảng 2. KLPT, chỉ số đa phân tán (PI) và ĐĐA của chitosan thu được từ chiếu xạ dung dịch chitosan 4 %/ H_2O_2 0,5 % sau xử lí cắt mạch dị thể bằng H_2O_2 1 và 2 %.

Mẫu	Liều xạ (kGy/h)	0	3,5	7	10,5	14	17,5	21
CTS/H_2O_2 1 %	Mw (kDa)	45,5	17,9	12,6	8,9	6,6	5,5	5,0
	ĐĐA (%)	91,4	89,9	89,1	88,6	88,0	87,6	87,2
	PI	3,37	2,78	2,52	2,48	2,18	1,97	1,88
CTS/H_2O_2 2 %	Mw (kDa)	35,3	15,9	7,1	6,0	5,2	4,1	3,7
	ĐĐA (%)	87,9	80,1	77,3	76,8	74,9	72,9	71,4
	PI	3,4	2,9	2,2	2,1	1,9	1,8	1,7

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy KLPT của chitosan giảm khi tăng liều xạ. KLPT của mẫu chitosan/H_2O_2 1 % giảm nhanh từ 45,5 xuống 8,9 kDa khi tăng liều xạ từ 0 đến 10,5 kGy và giảm chậm dần xuống 6,6; 5,5 và 5,0 kDa khi tăng liều xạ tương ứng 14, 17,5 và 21 kGy. Xu hướng tương tự cũng thu được đối với mẫu chitosan/H_2O_2 2 %, KLPT giảm nhanh từ 35,3 xuống 6,0 kDa và giảm chậm xuống 3,7 kDa khi tăng liều xạ từ 0 lên 21 kGy. Tuy nhiên, ĐĐA của mẫu chitosan/H_2O_2 2 % giảm nhiều hơn so với mẫu chitosan/H_2O_2 1 %. ĐĐA của mẫu chitosan/H_2O_2 2 % giảm từ 87,9 xuống 71,4 % trong khi đó ĐĐA của mẫu chitosan/H_2O_2 % chỉ giảm từ 91,4 xuống 87,2 %. Kết quả này cho thấy nồng độ H_2O_2 1 % là nồng độ thích hợp để xử lí cắt mạch dị thể tạo chitosan KLPT thấp và khoảng liều xạ từ 14 đến 21 kGy là phù hợp để tạo oligochitosan từ chitosan KLPT thấp.

Về cơ chế cắt mạch chitosan trong dung dịch chứa H_2O_2 xảy ra theo cơ chế đồng vận [19, 20, 21]. Hiệu ứng đồng vận đã chứng minh việc xử lí cắt mạch đồng thời bức xạ gamma Co-60 và H_2O_2 cho hiệu quả cắt mạch cao hơn khi sử dụng riêng rẽ từng tác nhân cắt mạch [20]. Cơ chế cắt mạch bằng hiệu ứng đồng vận (tia γ và H_2O_2) được giải thích là do dưới tác dụng của tia bức xạ, nước và H_2O_2 bị phân li tạo thành nên gốc tự do hydroxyl (${}^{\bullet}OH$) có tính oxi hóa mạnh, làm tăng hiệu quả cắt mạch chitosan [19].



Hình 1. Phổ IR của chitosan ban đầu(a), chitosan/H_2O_2 1 % (b) và chitosan/H_2O_2 1 % được chiếu ở những liều xạ 3,5 (c) 7 (d), 10,5 (e), 14(f), 17,5 (g) và 21 kGy (h).

Kết quả FT-IR Hình 1 cho thấy hầu như mẫu chitosan (a) sau khi ngâm H_2O_2 1 % (b) và các mẫu chitosan sau khi chiếu xạ ở liều xạ khác nhau vẫn giữ được các mũi đặc trưng và gần như không sự thay đổi cấu trúc so với chitosan ban đầu. Mũi đặc trưng cho nhóm carboxyl (1735 cm^{-1}) hình thành do sự mở vòng glucozit trong quá trình cắt mạch chitosan đã được Qin et al. nghiên cứu [18]. Tuy nhiên, mũi này không xuất hiện trên phổ IR (Hình 1). Điều đó chứng tỏ oligochitosan không bị cacboxyl hóa. Kết quả này tương tự như những kết quả của các tác giả đã nghiên cứu cắt mạch chitosan bằng bức xạ trước đây [19, 20, 21].

3.2. Kết quả khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra

3.2.1. Kết quả khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra của oligochitosan

Bảng 4. Độ tăng trọng, tốc độ tăng trưởng đặc biệt (TĐTTĐB) của cá tra sau 45 ngày ăn thức ăn có bổ sung oligochitosan ở các nồng độ khác nhau và và tỉ lệ sống của cá tra sau 21 ngày nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri.*

Nghiệm thức (NT)	Trọng lượng thân ban đầu (g)	Trọng lượng thân cuối (g)	Tăng trọng (g)	TĐTT (%/ngày)	Tỉ lệ sống (%)
ĐC -	20,01 ± 0,10[a]	49,26 ±4.08[a]	29,25 ± 4,04[a]	2,00 ± 0,05[a]	100,00 ± 0,00[a]
ĐC +	20,21± 0,34[a]	51,34 ±2.16[a]	31,13 ± 2,16[a]	2,07 ± 0,04[a]	8,89 ± 1,96[a]
NT1	20,24 ± 0,03[a]	50,74 ± 5.52[a]	30,50 ± 5,52[a]	2,04 ± 0,08[a]	22,70 ± 1,87[b]
NT2	21,07 ± 0,11[a]	60,66 ± 2.65[b]	39,32 ± 2,17[b]	2,35 ± 0,08[b]	47,62 ± 1,83[c]
NT3	20,19 ± 0,10[a]	58,09 ± 4.02[b]	37,84 ± 4,07[b]	2,35 ± 0,09[b]	43,17 ± 2,30[c]

Ghi chú: Các kí tự khác nhau trong cùng một cột chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), số liệu thể hiện là giá trị trung bình và sai số chuẩn (SD).

Trong đó:

- ĐC - (không bổ sung oligochitosan) không gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- ĐC + (không bổ sung oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 1 (bổ sung 50 mg/kg oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 2 (bổ sung 100 mg/kg oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 3 (bổ sung 200 mg/kg oligochitosan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri.*

Kết quả Bảng 4 cho thấy cá được ăn thức ăn có bổ sung oligochitosan độ tăng trọng cũng như tốc độ tăng trưởng cao hơn so với mẫu cá đối chứng. Ở nồng độ oligochitosan 50 mg/kg chưa đủ để ảnh hưởng đến sự tăng trọng nên không có sự khác biệt đối với mẫu cá đối chứng. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ oligochitosan lên 100 mg/kg thì đã có sự khác biệt, Mẫu đối chứng có độ tăng trọng là 31,13 g và tốc độ tăng trọng đạt 2,07 %/ngày thì mẫu cá được ăn thức ăn có bổ sung oligochitosan 100 mg/kg các giá trị trên tương ứng là 39,32 g và 2,35 %/ngày. Tiếp tục tăng nồng độ oligochitosan lên 200 mg/kg thì không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu oligochitosan 100 mg/kg. Gopalakanan và cs [3] thu được kết quả tương tự khi cho cá chép (*Cyprinus carpio*) ăn thức ăn có bổ sung chitosan 1 % trong thời gian 30 ngày. Khối lượng của cá sau 30 ngày ăn thức ăn có bổ sung chitosan 1 % là 94,92 ± 9,36 g so với khối lượng cá ban đầu là 7,4 ± 0,40 g, trong khi đó mẫu đối chứng khối lượng cá chỉ đạt 47,31 ± 5,20 g. Như vậy, kết quả cho thấy nồng độ hiệu dụng của oligochitosan (100 mg/kg) thấp hơn nhiều so với chitosan (10.000 mg/kg) [3].

Kết quả về tỉ lệ sống của cá tra sau khi ăn thức ăn có bổ sung oligochitosan và được gây nhiễm bệnh gan thận mủ bằng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* được thể hiện trong Bảng 4 cho thấy khi nồng độ oligochitosan tăng thì hiệu ứng kháng bệnh của cá tăng lên biểu hiện qua tỉ lệ sống tăng. Đối với mẫu mẫu cá bổ sung 50 mg/kg oligochitosan tỉ lệ sống tăng lên 22,70 ± 1,87 % và đạt cao nhất ở nồng độ 100 mg/kg là 47,62 ± 1,83 % so với mẫu đối chứng tỉ lệ sống chỉ đạt 8,89 ± 1,96 %. Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nồng độ oligochitosan lên 200 mg/kg thì tỉ lệ sống của cá không khác biệt so với nồng độ 100 mg/kg. Kết quả trên cũng cho thấy nồng độ thích hợp để sử dụng oligochitosan như là chất kích kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra là 100 mg/kg. Điều này có thể giải thích là do oligochitosan chỉ có tác dụng kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu (nonspecific immunity) của cá. Miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào là hai quá trình quan trọng của miễn dịch không đặc hiệu của cá. Đối với miễn dịch dịch thể, oligochitosan có tác dụng giúp tăng cường bổ thể (complement), interferon (IFN) và hoạt tính men lysozyme. 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 glycoprotein do bạch cầu (T-lymphocyte) 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, oligochitosan có vai trò kích thích quá trình thực bào (phagocytosis) của tiểu thực bào (microphage) và đại thực bào (macrophage) [3 - 7]. Kết quả trên cũng cho thấy nồng độ thích hợp để sử dụng oligochitosan như là chất kích kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra là 100 mg/kg.

3.2.2. Kết quả khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra của oligoβ-glucan

Kết quả về tăng trọng và tốc độ tăng trưởng trong bảng 5 cho thấy cá tra được ăn thức ăn có bổ sung oligoβ-glucan trong 45 ngày có sự gia tăng đáng kể về độ tăng trọng cũng như tốc độ trưởng so với mẫu đối chứng. Cụ thể, ở nồng độ 50 mg/kg chưa thấy sự khác biệt về độ tăng trọng và tốc độ tăng trưởng so với mẫu đối chứng. Điều này chứng tỏ ở nồng độ oligoβ-glucan thấp thì chưa thể hiện hiệu ứng về sự tăng trọng. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 100 và 200 mg/kg thì độ tăng trọng và tốc độ tăng trưởng đã khác biệt so với mẫu đối chứng. Độ tăng trọng tăng lên 50,89 ± 3,89 g và đạt tốc độ tăng trưởng là 2,80 ± 0,08 %/ngày đối với mẫu oligoβ-glucan 100 mg/kg trong khi đó mẫu đối chứng chỉ đạt là 39,87 ± 2,16 g và 2,40 ± 0,04 %/ngày sau 45 ngày nuôi. Ở nồng độ oligoβ-glucan 200 mg/kg không có sự khác biệt về độ tăng trọng và tốc độ tăng trưởng so với nồng độ 100 mg/kg.

Bảng 5. Độ tăng trọng, tốc độ tăng trưởng đặc biệt của cá tra sau 45 ngày ăn thức ăn có bổ sung oligoβ-glucan ở các nồng độ khác nhau và và tỉ lệ sống của cá tra sau 21 ngây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri.*

Nghiệm thức (NT)	Trọng lượng thân ban đầu (g)	Trọng lượng thân cuối (g)	Tăng trọng (g)	TĐTT (%/ngày)	Tỉ lệ sống (%)
ĐC -	21,01 ± 0,15[a]	59,26 ±4.08[a]	38,25 ± 4,04[a]	2,30 ± 0,05[a]	100,00 ± 0,00
ĐC +	20,47± 0,28[a]	60,34 ±2.16[a]	39,87 ± 2,16[a]	2,40 ± 0,04[a]	10,09 ± 1,46 [a]
NT4	20,74 ± 0,03[a]	62,44 ± 5.82[a]	41,70 ± 5,82[a]	2,45 ± 0,09[a]	25,08 ± 2,12 [b]
NT5	20,19 ± 0,60[a]	71,08 ± 3.05[b]	50,89 ± 3,89[b]	2,80 ± 0,08[b]	46,67 ± 2,58 [c]
NT6	21,22 ± 0,10[a]	72,87 ± 3.82[b]	51,65 ± 3,82[b]	2,74 ± 0,09[b]	48,89 ± 1,96 [c]

Ghi chú: các kí tự khác nhau trong cùng một cột chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), số liệu thể hiện là giá trị trung bình và sai số chuẩn (SD).

Trong đó:
- ĐC - (không bổ sung oligoβ-glucan) không gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- ĐC + (không bổ sung oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 4 (bổ sung 50 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 5 (bổ sung 100 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*
- NT 6 (bổ sung 200 mg/kg oligoβ-glucan) gây nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri.*

Kết quả kích kháng bệnh gan thận mủ của oligoβ-glucan thu được cũng tương tự như của oligochitosan. Khi nồng độ oligoβ-glucan tăng thì hiệu ứng kháng bệnh của cá tăng, thể hiện qua tỉ lệ sống của cá tăng. Đối với mẫu không bổ sung oligoβ-glucan tỉ lệ sống chỉ đạt 10,09 ± 1,46%, trong khi đó mẫu cá bổ sung 50 mg/kg tỉ lệ sống tăng lên 25,08 ± 2,12 % và đạt cao nhất trong khoảng nồng độ 100 - 200 mg/kg là 48,89 ± 1,96 %. Trong công trình trước đây của chúng tôi khi nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh của β-glucan cắt mạch bằng phương pháp chiếu xạ đối với cá rô phi [11], cho thấy tỉ lệ sống của cá rô phi sau khi gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* cũng tăng lên là 63,33 ± 5,77 %; 73,76 ± 2,89 % và 76,00 ± 5,00 % tương ứng với nồng độ oligoβ-glucan là 50, 100 và 150 mg/kg so với mẫu đối chứng là 49,43 ± 10,41 %. Trong công trình của Misra và cs [22] khảo sát ảnh hưởng nồng độ của β-glucan ở các nồng độ 0, 100, 250 và 500 mg/kg thức ăn đến khả năng kháng bệnh của cá hồi sau khi được gây nhiễm với hai loại vi khuẩn là *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiela tarda.* Kết quả thu được sau 56 ngày cho cá ăn thức ăn có bổ sung β-glucan thì các thông số sinh hóa và huyết học như tổng hàm lượng huyết thanh protein, hàm lượng glubin, albumin, gluocose và các chỉ số miễn dịch như hoạt động thực bào, hoạt tính lysozym, số lượng bạch cầu,.. đều tăng so với mẫu đối chứng không bổ sung β-glucan và đạt giá trị cao nhất ở 42 ngày. Tốc độ tăng trưởng cũng tăng cao hơn so với mẫu đối chứng. Đặc biệt, tỉ lệ cá sống tăng khi tăng nồng độ β-glucan và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ 250 mg/kg thức ăn sau 28 ngày gây nhiễm bệnh, khi tăng nồng độ β-glucan lên 500 mg/kg thức ăn thì tỉ lệ cá sống giảm. Như vậy, nồng độ tối ưu của β-glucan trong công trình của Misra và cs khi bổ sung β-glucan vào thức ăn cho cá hồi để làm chất kích kháng bệnh là 250 mg/kg [22]. Giá trị này cao hơn giá trị tối ưu trong công trình của chúng tôi (100 mg/kg), sự khác biệt này có thể do Misra và cs [22] đã sử dụng β-glucan có KLPT cao hơn so với KLPT của oligoβ-glucan sử dụng trong nghiên cứu này.

4. KẾT LUẬN

Oligochitosan và oligoβ-glucan được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 dung dịch chitosan và β-glucan kết hợp với H_2O_2. Oligochitosan có KLPT ~ 5000 - 7000 Da được chế tạo từ dung dịch chitosan 5 %/H_2O_2 0,5 % chiếu xạ trong khoảng liều 14 - 21 kGy. Oligoβ-glucan có KLPT ~ 6000 - 10000 Da thu được bằng cách chiếu xạ dung dịch oligoβ-glucan 10 %/H_2O_2 1% trong khoảng liều 15 - 20 kGy [11]. Kết quả khảo sát hiệu ứng kháng bệnh gan thận mủ trên cá tra của oligochitosan và oligoβ-glucan cho thấy cả hai loại oligosaccarit đều có hiệu ứng kháng bệnh tốt đối với vi khuẩn *E. ictaluri*. Tỉ lệ cá sống sau 21 ngày gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* của cá ăn thức ăn bổ sung oligochitosan (100 mg/kg) là 47,62 % so với đối chứng là 8,90 % và cá ăn thức ăn bổ sung oligoβ-glucan (100 mg/kg) là 46,67 % so với đối chứng là 10,09 %. Kết quả cho thây oligochitosan và oligoβ-glucan có hoạt tính kích thích miễn dịch gia tăng khả năng kháng bệnh và tăng trọng đối với cá nên rất có tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy hải sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Tiêu Ta và CS - Quy hoạch phát triển nuôi trồng thủy sản vùng đồng bằng sông cửu long đến năm 2015, định hướng đến năm 2020, Dự án cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Hà Nội, 2009, tr. 1-5.
2. Từ Thanh Dung và cs - Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra *(Pangasius hypophthalmus)*, Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ (2004) 137-142.
3. Gopalakannan A et al. - Immunomodulatory effect of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds, Aquaculture **255** (2006)179–187.
4. Mantovani S.M. et al. - β-Glucan in promoting health: Prevention against mutation and cancer, Mutation Research **658** (2008) 154-161.
5. Misra K.C. et al. - Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings, Aquaculture **255** (2006) 82–94.
6. Chae B. J. et al. - Effects of suplementation of β-glucan on the growth performance and immunity in broilers, Reseach in Veterinary Science **80** (2006) 291-298.
7. Suphantharika M. et al. - Preparation of spent brewer's yeast β-glucan with a potential application as an immunostimulant for black tiger shirmp, *Penaeus monodon*, Bioresourse Technology **88** (2003) 55-60.
8. Prashanth K. V. H. et al. - Chitin/chitosan modification and their unlimited application potential – an overview, Trend in Food ScicienceTechnology **18** (2007)117–131.
9. Hirano S. et al. - Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds, Journal Agricultural Food Chemistry **38** (1980) 1214–1217.
10. Gómez C. et al. - Physical and structural properties of barley (1-3), (1-4)-D-glucan-III. Formation of aggregates analysed through its viscoelastic and flow behavior, Carborhydrate Polymers **34** (1997) 141-148.
11. Nguyễn Ngọc Duy và cs – Nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh của β-glucan cắt mạch bằng phương pháp chiếu xạ đối với cá rô phi, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **51** (2013) 737-745.

12. Hien N.Q. et al. - Degradation of α-Chitosan by combined treatment with hydroperoxide and gamma Co-60 radiation, Nuclear Science and Technology **4** (2008) 44-51.
13. Brugnerotto J. et al. - An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, Polymers **42** (2001) 3569-3580.
14. Dang Xuan Du et al.- Degradation of chitosan by γ-irradiation of chitosan swollen in hydrogen peroxide solution, Jounal of Science and Technology **52** (2014), 441-450.
15. Qun G. et al. - Effect of reacetylation and degradation on the chemical and crystal structures of chitosan, Journal of Applied Polymer Science **104** (2007) 2720-2728.
16. Qin C.Q. et al. - Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan, Polymer Degradation and Stability **76** (2002) 211-218.
17. Feng T. et al. - Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide, Carbohydrate Polymers **57** (2004) 31-37.
18. Sonntag V. et al. - Free-radical reaction of carbohydrates as studied by radiation techniques. In R. Stuart Tipson, & Derek Horton (Eds), Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry **37** (1980) 7-77.
19. Duy N.N. et al. - Synergistic degradation to prepare oligochitosan by g-irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide, Radiation Physics and Chemistry **80** (2011) 848–853.
20. Hien N.Q. et al. - Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxid, Carbohydrate Polymers **87** (2012) 953-938.
21. Kang B. et al. - Synergectic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide, Polymer Degradation and Stability **92** (2007) 359-362.
22. Misra C.K. et al.- Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohita fingerlings, Aquaculture **255** (2006) 82-94.

ABSTRACT

STUDY ON PREPARATION AND EFFECT OF OLIGOβ-GLUCAN AND OLIGOCHITOSAN ON IMMUNE STIMULATION WHITE PATCHES IN THE INTERNAL ORGANS DISEASE ON TRA CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus)*

Nguyen Ngoc Duy[1,*], Dang Van Phu[1], Le Anh Quoc[1], Nguyen Thi Kim Lan[1], Nguyen Quoc Hien[1], Pham Dinh Dung[2], Pham Duy Hai[3], Nguyen Van Nguyen[3]

[1]*Research and Development Center for Radiation Technology, Vietnam Atomic Energy Institue Thu duc District, Ho Chi Minh City*

[2]*Research and Development Center for Hi-Tech Agriculture, Cu chi District, Ho Chi Minh City*

[3]*Research Insitute for Aquaculture No.2, 3 District Ho Chi Minh City*

[*]Email: *ngocduy158@yahoo.com*

Oligoβ-glucan and oligochitosan were prepared by gamma Co-60 irradiation of β-glucan/H_2O_2 and chitosan/H_2O_2 solution. The efficiency of the degradation process was determined by gel permeation chromatography (GPC) method. Results showed that the Mw

decreased with increasing concentration of H_2O_2 and doses. For oligoβ-glucan, Mw reduced from 56.7 kDa to 7.1 kDa when β-glucan 10 %/H_2O_2 1 % solution was irradiated at 14 kGy. For oligochitosan, Mw reduced from 45.5 kDa to 5.0 kDa when chitosan 4 %/H_2O_2 0.5 % solution was irradiated at 21 kGy. Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus)* was fed with oligoβ-glucan and oligochitosan in various concentrations of 0, 50, 100, and 200 mg/kg feed for 45 days and then was challenged with *Edwardsiella ictaluri* bacteria to investigate immune stimulation effect against white patches in the internal organs disease. The results indicated that oligoβ-glucan and oligochitosan exhibited good immune stilmulation effect with optimum concentration of 100 mg/kg feed.

Keywords: oligoβ-glucan, oligochitosan, immune stilmulation, tra catfish.