

THÔNG BÁO KHOA HỌC

DEPOLYMER CHITIN THU NHẬN PHÂN ĐOẠN OLIGOCHITIN BẰNG AXIT CLOHYDRIC, CHIẾU XẠ GAMMA VÀ CHITINASE

DEPOLYMERIZATION OF CHITIN BY HYDROCHLORIC ACID, GAMMA IRRADIATION AND CHITINASE

Trần Văn Vương¹, Nguyễn Anh Tuấn¹, Vũ Ngọc Bội¹

Ngày nhận bài: 22/8/2018; Ngày phân biện thông qua: 20/9/2018; Ngày duyệt đăng: 28/9/2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả depolymer chitin (α -chitin) bằng axit clohydric, chiếu xạ gamma và chitinase dựa vào lượng phân đoạn oligochitin A (1-3 kDa) và B (<1 kDa) thu nhận bằng màng siêu lọc. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp quét gốc tự do DPPH, oxy hóa màng lipid và hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn mục tiêu bằng phương pháp đục lỗ thạch, MIC của các phân đoạn oligochitin thu nhận. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai phân đoạn oligochitin A và B đều có hoạt tính chống oxy hóa, có khả năng ức chế với chủng vi khuẩn mục tiêu, tuy nhiên phân đoạn oligochitin A có hoạt tính mạnh hơn rất nhiều phân đoạn oligochitin B. Hàm lượng phân đoạn oligochitin A thu nhận bằng chiếu xạ gamma cao nhất (80,5%), thấp nhất là HCl (9,8%). Nghiên cứu này cho thấy depolymer chitin bằng chiếu xạ gamma (Co-60, liều chiếu 250 kGy) cho hiệu quả (thu nhận được lượng phân đoạn oligochitin A) cao nhất.

Từ khóa: chitin, phân đoạn oligochitin, depolymer chitin, chiếu xạ γ

ABSTRACT

This study evaluated the effect of chitin depolymer (α -chitin) on hydrochloric acid, gamma irradiation and chitinase based on oligochitin A (1-3 kDa) and B (<1 kDa) by ultrafiltration membrane. Besides, the study evaluated the antioxidant activity by DPPH radical scavenging, lipid oxidation and antibacterial activity against the target bacterial strains by agar, MIC of oligochitin fractions receive. The results showed that oligochitin A and B have both antioxidant activity and inhibitory activity against the target bacterium, but oligochitin A activity is much stronger than that of oligochitin B. The oligochitin A fraction received the highest gamma irradiation (80.5%), the lowest was HCl (9.8%). This study showed that the depolymer chitin gamma irradiation (Co-60, 250 kGy) gave the highest (oligochitin A fraction) yield

Keywords: chitin, oligochitins, chitin depolymer, gamma irradiation

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là một polysaccharide tự nhiên, một homopolymer của N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) có độ kết tinh cao nên thực tế chitin không tan trong nước và các dung môi hữu cơ khác nên việc sử dụng chitin trong công nghiệp rất hạn chế. Chitin có ba dạng cấu trúc, α -chitin, β -chitin và γ -chitin. Dạng α -chitin có nhiều trong vỏ tôm, cua và thành tế bào nấm, β -chitin có mặt trong một số loài động vật và tảo được sử dụng phổ biến, độ deacetyl dao động từ

8-12%, khối lượng phân tử trung bình (Mw) từ 1,0-2,5x10⁶ dalton (Da) [1], [4], [6].

Nghiên cứu gần đây cho thấy chitin ở dạng phân tử lượng thấp (oligochitin) có khả năng ứng dụng rộng hơn. Điều này là do ngoài khả năng hòa tan trong nước cũng như các dung môi hữu cơ chúng còn không độc và có khả năng chống oxy hóa cao [20], [28], ức chế vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và vi nấm [12], [28].

Sử dụng axit là phương pháp đơn giản và nhanh chóng để sản xuất loạt oligochitin từ chi-

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

tin. Tuy nhiên, nó có một số nhược điểm như chi phí cao và hiệu quả thấp; nó cũng dẫn đến sự biến đổi hóa học cũng như những thay đổi trong cấu trúc tinh thể chitin. Do đó, oligochitin được sản xuất bằng phương pháp này có nguy cơ độc vì các biến đổi này. Mặt khác phương pháp sử dụng axit còn cho thấy một số nhược điểm như vấn đề ăn mòn, phản ứng khó kiểm soát, độ lặp lại yếu và tạo muối khi trình trung hòa [1], [6].

Sử dụng enzyme cho phép depolymer chitin tự nhiên một cách chọn lọc trong điều kiện tối ưu. Đặc biệt phương pháp này có thể thủy phân được chitin ở dạng không hòa tan trong nước, cho phép thu nhận các oligochitin theo định hướng mà không cần phải có các mô hình hóa học, oligochitin thu được sạch. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm về kinh tế do chi phí enzyme cao, enzyme được sử dụng thường không thực sự đặc hiệu, lượng enzyme sử dụng nhiều, thời gian thủy phân thường kéo dài [14], [19].

Sử dụng chiếu xạ gamma cho phép depolymer chitin tự nhiên dựa trên các hiệu ứng chiếu xạ của tia gamma. Đây là một phương pháp tương đối sạch trong sản xuất các oligochitin (do không cần sử dụng phụ gia, hóa chất, không cần kiểm soát nhiệt độ môi trường chỉ cần kiểm soát và điều chỉnh liều chiếu của thiết bị chiếu) và có thể sản xuất ở quy mô công nghiệp với số lượng lớn. Mặt khác, có thể depolymer chitin ở dạng rắn thạch và lỏng. Tuy nhiên mẫu ở dạng lỏng sẽ depolymer nhanh hơn, liều chiếu thấp hơn do năng lượng bức xạ ion hóa được hấp thụ bởi nước. Tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là chiếu không định hướng, mẫu có hiện tượng bị cháy khi tăng liều chiếu [15], [16].

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả depolymer chitin (α -chitin) bằng axit clohydric, chiếu xạ gamma và chitinase. Hiệu quả depolymer chitin được đánh giá thông qua khả năng depolymer thu nhận phân đoạn oligochitin A: 1-3kDa và B: <1kDa. Ngoài ra, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn các phân đoạn oligochitin thu được cũng được đánh giá.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu

Chitin có nguồn gốc từ tôm thẻ (α -chitin), sản xuất tại phòng thí nghiệm trường Đại học Nha Trang (độ mịn $\leq 0,1\text{mm}$, trắng ngà, độ ẩm 8%, độ deacetyl 26%, MV 905 kDa, protein 0,42%, tro tổng 0,25%).

HCl loại dùng trong thí nghiệm xuất xứ Sigma-Aldrich. Chitinase (EC 3.2.1.14) loại endochitinase có nguồn gốc từ *Streptomyces griseus*, hoạt độ ≥ 200 units/g xuất xứ Sigma-Aldrich. Chiếu xạ γ (Co-60) từ thiết bị Gamma Chamber 5000 tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Hóa chất còn lại đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích hóa học xuất xứ Guanhua, Trung Quốc.

2. Cách tiến hành thí nghiệm

2.1. Thí nghiệm depolymer chitin tự nhiên bằng axit clohydric (HCl)

Cân chitin cho vào dung dịch HCl 12M tỷ lệ 1/10 (w/v) thu hỗn hợp chitin 10%. Cho hỗn hợp vào bể ổn nhiệt ở 50°C trong thời gian 7h, sau đó bổ sung nước cất lạnh tỷ lệ 4/1 (v/v), trung hòa bằng NaOH 25%. Hỗn hợp thu được được ly tâm (10000 vòng/phút, thời gian 10 phút) để loại bỏ cặn không hòa tan, thu được phần dịch. Phần dịch thu được đem đi xác định hàm lượng đường khử (GlcNAc) và tách bằng màng UF thu 2 phân đoạn oligochitin A và B (A: 1-3 kDa, B: <1 kDa). Phân đoạn oligochitin thu được đem đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn.

2.2. Thí nghiệm depolymer chitin tự nhiên bằng chiếu xạ gamma (γ)

Cân chitin cho vào dung dịch HCl 30% tỷ lệ 1/4 (w/v), cho vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 40°C và khuấy liên tục trong 3 phút, thêm từ từ nước lạnh (2-4°C) tỷ lệ 9/1 (v/v). Hỗn hợp thu được đem ly tâm (3500 vòng/phút, thời gian 15 phút) thu huyền phù, tiếp tục lặp lại tới khi huyền phù có pH = 4,5 và nồng độ chitin 10%. Đem hỗn hợp huyền phù đi chiếu xạ γ (Co-60) bằng thiết bị Gamma Chamber 5000 với liều chiếu 250 kGy, xuất liều 2,5 kGy/giờ. Hỗn hợp thu được được ly tâm (10000 vòng/phút, thời gian 10 phút) để loại bỏ cặn không hòa tan, thu được

phần dịch. Phần dịch thu được đem đi xác định hàm lượng đường khử (GlcNAc) và tách bằng màng UF thu 2 phân đoạn oligochitin A và B (A: 1-3 kDa, B: <1 kDa). Phân đoạn oligochitin thu được đem đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn.

2.3. Thí nghiệm depolymer chitin tự nhiên bằng chitinase

Lấy hỗn hợp huyền phù chitin (pH =4,5 nồng độ 10%) chuẩn bị ở phần 2.1.2, bổ sung chitinase (EC 3.2.1.14) có hoạt độ 0,3 U/mg, tỷ lệ 1/100 (v/v) sau đó cho vào bể ổn nhiệt ở 40°C trong thời gian 5,5 ngày. Lấy mẫu ra, đun sôi để bất hoạt chitinase, để nguội sau đó đem ly tâm (10000 vòng/phút, thời gian 10 phút) để loại bỏ cặn không hòa tan, thu được phần dịch. Phần dịch thu được đem đi xác định hàm lượng đường khử (GlcNAc) và tách bằng màng UF thu 2 phân đoạn oligochitin A và B (A: 1-3 kDa, B: <1 kDa). Phân đoạn oligochitin thu được đem đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn.

3. Phương pháp sử dụng trong phân tích

Xác định hàm lượng đường khử (GlcNAc) tạo thành theo phương pháp của Yu và cs [27] với một vài hiệu chỉnh. Cụ thể: Lấy 3ml dung dịch sau ly tâm tách cặn và 1ml dung dịch DNS 1% cho vào ống nghiệm lắc đều, cho vào bể ổn nhiệt, ủ trong 10 phút để phản ứng màu xảy ra (màu nâu đỏ). Thêm vào ống nghiệm 1ml dung dịch kali natri tartarate 40% để ổn định màu. Đo OD trên thiết bị UV-Vis ở bước sóng 575 nm. Tính hàm lượng GlcNAc dựa trên đường chuẩn đã xây dựng.

Xác định lượng phân đoạn oligochitin A (1-3 kDa) và B (<1 kDa) thu nhận theo phương pháp của Joen [11] với một vài hiệu chỉnh. Cụ thể: Dung dịch thu được sau ly tâm, lọc qua màng lọc Z355151 sigma (MWCO 3 kDa) thu dịch lọc, dịch lọc tiếp tục lọc qua màng lọc Z355135 sigma (MWCO 1 kDa) thu 2 phần (dịch lọc và phần giữ lại trên giấy lọc) đem đi sấy khô chân không thu phân đoạn oligochitin A và B (dạng bột).

Đánh giá hoạt tính khử gốc tự do DPPH theo phương pháp của Rajalakshmi và cs [25], Tuberoso và cs [24] với một vài hiệu chỉnh. Cụ thể: Hòa tan phân đoạn oligochitin ở các nồng

độ lần lượt là 1, 2, 3 và 4 mg/ml. Lấy 5 ống nghiệm, cho vào mỗi ống nghiệm 0,5 ml phân đoạn oligochitin ở từng ống độ đã pha ở trên, ống còn lại cho 0,5 ml nước cất (mẫu trắng). Thêm 2,5 ml dung dịch DPPH 0,1 mmol/l vào mỗi ống nghiệm. Lắc đều mẫu và đem đo OD trên thiết bị UV-Vis ở bước sóng 517 nm. Xác định khả năng quét gốc tự do (SA %) DPPH.

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa màng lipid theo phương pháp của Qian ZJ và cs [23] với một vài hiệu chỉnh. Cụ thể: Hòa tan phân đoạn oligochitin ở các nồng độ lần lượt là 1, 2, 3 và 4 mg/ml. Lấy 5 ống nghiệm, cho vào mỗi ống nghiệm 2ml phân đoạn oligochitin ở từng ống độ đã pha ở trên, ống còn lại cho 2ml nước cất (mẫu trắng). Cho tiếp 2ml dung dịch axit linoleic 2,5% và 4ml dung dịch đệm Na₃PO₄ (pH=7) vào mỗi ống nghiệm. Lắc đều các ống nghiệm, ủ trong phòng tối (96 h) ở nhiệt độ 40°C. Đo OD mẫu trên thiết bị UV-Vis ở bước sóng 500 nm. Xác định khả năng chống oxy hóa màng lipid (%).

Đánh giá khả năng kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm bằng phương pháp đục lỗ thạch. Cụ thể: Cho vào đĩa petri 15ml môi trường NA để tạo mặt thạch, chủng vi khuẩn thử nghiệm được kích hoạt bằng môi trường TSB (mật độ cố định khoảng 1-2x10⁸ CFU/ml), pha phân đoạn oligochitin nồng độ 1% trong nước cất, dùng pipetman hút chính xác 100µl dung dịch vi khuẩn đã kích hoạt cho vào đĩa petri đã chuẩn bị, trải đều vi khuẩn lên trên mặt thạch bằng que trải thủy tinh, để bề mặt thạch khô, tiến hành đục lỗ thạch, dùng pipetman hút chính xác 100µl phân đoạn oligochitin đã pha cho vào các lỗ thạch, ủ các đĩa petri trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C, đọc kết quả.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm bằng phương pháp MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Cụ thể: Cho vào đĩa petri 15ml môi trường NA, pha phân đoạn oligochitin ở các nồng độ 50, 100, 250, 375, 500, 625, 750 và 1000 µg/ml cho vào từng đĩa petri đã chuẩn bị, chủng vi khuẩn thử nghiệm được kích hoạt bằng môi trường NB (mật độ cố định khoảng 1-2x10⁸ CFU/ml), dùng pipetman hút môi trường NB có chứa vi khuẩn thử nghiệm đã chuẩn bị cho lên trên mặt thạch của các đĩa

petri có chứa phân đoạn oligochitin ở các nồng độ khác nhau, mẫu đối chứng không có chứa chất thử nghiệm mà được thay bằng dung dịch nước cất, đem ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, đọc kết quả.

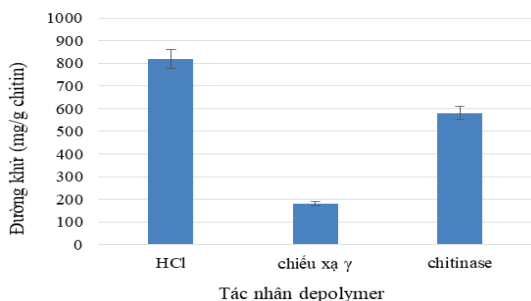
4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được trình bày trong bài báo là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Tính giá trị trung bình và vẽ đồ thị sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) của các giá trị trung bình được phân tích bằng phần mềm Statgraphics 16.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Xác định lượng đường khử tạo thành khi depolymer chitin bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase

Lượng đường khử (GlcNAc) tạo thành khi depolymer chitin bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase được trình bày trên đồ thị Hình 1.



Hình 1. Lượng đường khử tạo thành khi depolymer chitin bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase

Kết quả nghiên cứu thể hiện trên đồ thị hình 1 cho thấy tác nhân HCl lượng đường khử tạo ra lớn nhất 819±3,1 mg/g chitin, nhỏ nhất là chiếu xạ γ 181±1,9 mg/g chitin, chitinase đạt 581±2,1 mg/g chitin.

HCl có khả năng thủy phân mạnh, quá trình thủy phân chitin xảy ra ở vị trí liên kết 1,4-glucozit tạo thành các phân tử chitin mới có trọng lượng phân tử nhỏ hơn, sản phẩm cuối cùng là đường khử (GlcNAc), mặt khác quá trình thủy phân này thường xảy ra từ ngoài vào trong và không ngẫu nhiên. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Anh Dũng [1], A. Einbu [6], Ngo [20].

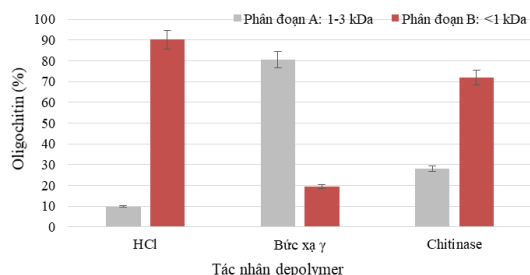
Chiếu xạ γ gây ra hiện tượng ion hóa, tạo các

gốc tự do peroxy tác động lên cấu trúc làm cho chitin bị depolymer tạo ra các phân tử chitin mới có phân tử lượng thấp. Tuy nhiên do quá trình depolymer chitin xảy ra một cách ngẫu nhiên, mặt khác do đặc tính của chiếu xạ là không thủy phân triệt để đến sản phẩm cuối cùng là đường khử (GlcNAc), nên sản phẩm chủ yếu là các oligochitin. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Anh Dũng [1], M. Dziril [15], M. Mahlous [17].

Chitinase là một enzyme đặc hiệu có khả năng thủy phân chitin mạnh, quá trình depolymer chitin xảy ra tại vị trí liên kết 1,4-glucozit tạo thành các phân tử chitin mới có trọng lượng phân tử nhỏ hơn, sản phẩm cuối cùng là đường khử (GlcNAc), quá trình thủy phân này diễn ra ngẫu nhiên từ trong ra ngoài và. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Anh Dũng [1], Aam [4], Laura [14].

2. Đánh giá lượng phân đoạn oligochitin A và B thu nhận

Kết quả đánh giá lượng phân đoạn oligochitin thu nhận khi depolymer chitin bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase được trình bày trên đồ thị Hình 2.



Hình 2. Lượng phân đoạn oligochitin A và B thu nhận khi depolymer chitin bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase

Kết quả nghiên cứu thể hiện trên đồ thị Hình 2 cho thấy khi depolymer bằng HCl phân đoạn oligochitin B thu được là lớn nhất (90,2±0,56%), phân đoạn oligochitin A là nhỏ nhất (9,8±0,17%); chiếu xạ γ phân đoạn oligochitin B thu được là nhỏ nhất (19,5±0,16%), oligochitin A là lớn nhất (80,5±0,46%); bằng chitinase phân đoạn oligochitin A và B thu được tương ứng là 28,1±0,24% và 71,9±0,39%.

HCl sử dụng có xu hướng thủy phân mạch chitin từ ngoài vào trong và không ngẫu nhiên, do đó sản phẩm của quá trình thủy phân chủ

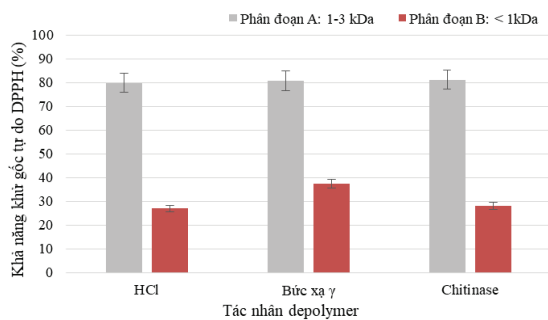
yếu là GlcNAc, các oligochitin thường không nhiều [1], [5], [11], [12].

Quá trình depolymer chitin bằng chiếu xạ γ xảy ra một cách ngẫu nhiên, mặt khác do đặc tính của chiếu xạ là không thủy phân triệt để nên sản phẩm chủ yếu là các oligochitin, sản phẩm dạng GlcNAc không nhiều [15], [17].

Quá trình depolymer chitin bằng chitinase thường thường từ trong ra ngoài và ngẫu nhiên, sản phẩm cuối cùng là GlcNAc. Do quá trình depolymer ngẫu nhiên nên sản phẩm thu được ngoài GlcNAc còn có phần tương đối lớn oligochitin [1], [12], [19].

3. Đánh giá khả năng khử gốc tự do DPPH phân đoạn oligochitin thu nhận

Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa thông qua đánh giá khả năng khử gốc tự do DPPH phân đoạn oligochitin A và B thu nhận được trình bày trên đồ thị Hình 3.



Hình 3. Khả năng khử gốc tự do DPPH phân đoạn oligochitin A và B thu nhận

Kết quả nghiên cứu thể hiện trên đồ thị Hình 3 cho thấy phân đoạn oligochitin A có khả năng khử gốc tự do DPPH tương đối cao (khoảng 80%), không có sự khác biệt về khả năng khử gốc tự do DPPH của phân đoạn oligochitin A thu nhận từ các tác nhân khác nhau. Phân đoạn oligochitin B khả năng khử gốc tự do DPPH tương đối thấp (khoảng 30%), phân đoạn B thu nhận từ chiếu xạ γ có khả năng khử gốc tự do DPPH mạnh hơn ($37,4 \pm 0,56\%$) so với phân đoạn B thu nhận từ HCl và chitinase ($26,9 \pm 0,21\%$ và $28,1 \pm 0,76\%$).

Phân đoạn oligochitin A: 1-3 kDa có chiều dài đoạn mạch vừa phải (5-15 monome) nên đủ linh động, mặt khác chúng còn chứa nhiều nhóm mang điện tích nên dễ tương tác với gốc

tự do DPPH [11], [13], [23].

Phân đoạn oligochitin B: <1 kDa có chiều dài đoạn mạch ngắn (1-4 monome), chủ yếu ở dạng mono nên chứa ít nhóm mang điện tích do vậy khả năng tương tác với gốc tự do DPPH kém hơn [19], [24].

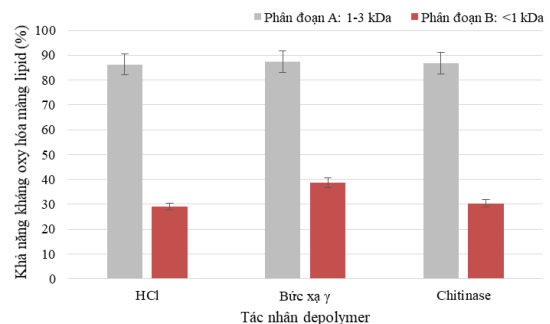
4. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa màng lipid phân đoạn oligochitin thu nhận

Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng chống oxy hóa màng lipid phân đoạn oligochitin A và B thu nhận được trình bày trên đồ thị hình 4.

Kết quả nghiên cứu thể hiện trên đồ thị hình 4 cho thấy phân đoạn oligochitin A có khả năng oxy hóa màng lipid tương đối cao (khoảng 87%), không có sự khác biệt về khả năng oxy hóa màng lipid của phân đoạn oligochitin A thu nhận từ các tác nhân khác nhau. Phân đoạn oligochitin B khả năng oxy hóa màng lipid tương đối thấp (khoảng 31%), phân đoạn B thu nhận từ chiếu xạ γ có khả năng oxy hóa màng lipid mạnh hơn ($38,8 \pm 0,46\%$) so với phân đoạn B thu nhận từ HCl và chitinase ($29,1 \pm 0,19\%$ và $30,4 \pm 0,36\%$).

Phân đoạn oligochitin A: 1-3 kDa có chiều dài đoạn mạch vừa phải (5-15 monome) nên đủ linh động, mặt khác chúng còn chứa nhiều nhóm mang điện tích nên dễ tương tác với gốc tự do DPPH [11], [13], [23].

Phân đoạn oligochitin B: <1 kDa có chiều dài đoạn mạch ngắn (1-4 monome), chủ yếu ở dạng mono nên chứa ít nhóm mang điện tích do vậy khả năng tương tác với gốc tự do DPPH kém hơn [19], [24].



Hình 4. Khả năng chống oxy hóa màng lipid phân đoạn oligochitin A và B thu nhận

5. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm phân đoạn oligochitin thu nhận

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm (*TVC*, *pseudomonas spp* và

shewanella putrefaciens) của phân đoạn oligochitin A và B thu nhận khi depolymer bằng HCl, chiếu xạ γ và chitinase thể hiện trong Bảng 1 như sau:

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm của phân đoạn oligochitin A và B thu nhận

STT	Chủng vi khuẩn thử nghiệm	Tác nhân depolymer chitin	Vùng ức chế (cm)		Giá trị MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			PD A	PD B	PD A	PD B
1	<i>TVC</i>	HCl	0,3 ^a	0,1 ^b	375 ^a	750 ^b
		Chiếu xạ γ	0,3 ^a	0,1 ^b	375 ^a	625 ^b
		Chitinase	0,3 ^a	0,1 ^b	375 ^a	625 ^b
2	<i>Pseudomonas spp</i>	HCl	0,5 ^a	0,1 ^b	250 ^a	750 ^b
		Chiếu xạ γ	0,5 ^a	0,2 ^b	250 ^a	625 ^b
		Chitinase	0,5 ^a	0,2 ^b	250 ^a	625 ^b
3	<i>Shewanella putrefaciens</i>	HCl	0,5 ^a	0,1 ^b	250 ^a	750 ^b
		Chiếu xạ γ	0,5 ^a	0,2 ^b	250 ^a	625 ^b
		Chitinase	0,5 ^a	0,2 ^b	250 ^a	625 ^b

a,b: Sự khác nhau về vùng ức chế (cm) đối chủng *TVC*, *Pseudomonas spp*, *Shewanella putrefaciens* của phân đoạn oligochitin A và B thu nhận từ các tác nhân là có ý nghĩa; PD A: phân đoạn A; PD B: phân đoạn B

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm phân đoạn oligochitin A và B theo phương pháp đục lỗ thạch trên Bảng 1 cho thấy trên các đĩa thạch đều xuất hiện vùng ức chế, tuy nhiên có sự khác biệt về độ lớn vùng ức chế của hai phân đoạn oligochitin A và B (A có khả năng kháng lớn hơn B). Điều này cho thấy phân đoạn oligochitin A và B thu được đều có khả năng kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm.

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm phân đoạn oligochitin A và B theo phương pháp MIC trên bảng 1 cho thấy giá trị MIC của phân đoạn A và B có sự khác biệt, giá trị MIC phân đoạn A nhỏ hơn (250-375 $\mu\text{g/ml}$) giá trị MIC phân đoạn B (625-750 $\mu\text{g/ml}$) nên hoạt tính kháng khuẩn vi khuẩn thử nghiệm mạnh hơn phân đoạn B rất nhiều.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chang [7], Joen [12], Wang [26], Zouhour [28].

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình depolymer chitin và đánh giá khả năng depolymer bằng các tác nhân HCl, chiếu xạ γ và chitinase theo quy trình để thu nhận phân đoạn oligochitin A (1-3kDa) và B (< 1kDa). Kết quả cho thấy depolymer chitin bằng HCl phân đoạn oligochitin A thu nhận thấp nhất (9,8%) và B cao nhất (90,2%), với chiếu xạ γ phân đoạn oligochitin A thu nhận cao nhất (80,5%) và B thấp nhất (19,5%). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy phân đoạn oligochitin A có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao hơn phân đoạn oligochitin B rất nhiều. Do vậy nên chọn chiếu xạ γ để depolymer chitin sẽ thu nhận được lượng phân đoạn oligochitin A nhiều nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng việt

1. Nguyễn Anh Dũng (2009). “Polysaccharide hoạt tính sinh học và ứng dụng”. NXB Giáo dục Việt Nam.
2. Đặng Trung Thành (2008). Bước đầu nghiên cứu thu nhận enzyme chitinase trong cây khoai lang tại Khánh Hòa, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ thủy sản*, số 03.
3. Trần Văn Vương (2013). *Nghiên cứu, lựa chọn tác nhân depolymer chitin tự nhiên thu nhận chitin phân tử lượng thấp (oligochitin)*, kết quả nghiên cứu HĐ nhánh số 24/2012 thuộc ĐTKH KC.07.02/11-15. Chủ nhiệm ĐTKH KC.07.02/11-15 PGS.TS Vũ Ngọc Bội, nghiệm thu 2016.

Tiếng Anh

4. Aam, B.B. et al (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Mar. Drugs* 2010, 8, 1482–1517.
5. A. Einbu et al (2004). Solution Properties of Chitin in Alkali. *Biomacromolecules* 5(5), 2048-2054.
6. A. Einbu, and K.M.Vårum (2007). Depolymerization and De-N-acetylation of Chitin Oligochitins in Hydrochloric Acid. *Biomacromolecules* 8, 309-314.
7. Chang, W. T., Chen, Y. C., & Jao, C. L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 98, 1224–1230.
8. Cho, Y. I., No, H. K. and Meyers, S. P. (1998). Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3839-3843.
9. Durango et al (2005). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 1-5.
10. El-Mougy et al (2006). Evaluation of different application methods of chitin and chitosan for controlling tomato root rot disease under greenhouse and field conditions. *R.J of Agriculture and Biological Science*, 2, 190-195.
11. Jeon, Y. J., & Kim, S. K. (2000). Production of oligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 41, 133–141.
12. Joen, Y-J., Shahidi, F., Kim, S-K (2000). Preparation of chitin and chitosan oligochitins and their applications in physiological functional foods. *Food Review International*, 16, 2, 159-776.
13. Kumar et al (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
14. Laura Ramirez-Coutino (2007). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinase. *Biochemistry*, 41, 1106-1110.
15. M. Dziril et al (2015). Chitin oligochitins and monomers production by coupling γ radiation and enzymatic hydrolysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 26, 396–401.
16. M. Mahlous *, D. Tahtat et al (2007). Gamma irradiation-aided chitin/chitosan extraction from prawn shells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 265 (2007), 414–417.
17. Mahmoud, N. S., Ghaly, A. K. (2006). Unconventional demineralization of crustacean waste for the production of chitin. *The Canadian Society for Bioengineering*, 6, 1-30.
18. M.S Benhabiles et al (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligochitins prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*.
19. Muzzarelli, R.A. (1997). “*Depolymerisation of chitins and chitosan with hemicellulase, lysosyme, papain and lipase*”. Chitin Handbook.
20. Ngo, D.; Lee, S.; Kim, M.; Kim, S. (2009). Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *J. Funct. Foods*, 1, 188–198.
21. Ngo, D et al (2008). Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydrate Polymers*, 74, 228.
22. Park, B. K., Kim, M.M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 5152-5164.
23. Qian ZJ et al (2008). Protective effect of an antioxidative peptid purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology* 99, 3365-3371.
24. Tuberoso et al (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food chemistry* 123, 1242-1251.
25. Rajalakshmi A., N.K. and A. Jayachitra (2013). Antioxidant Activity of the Chitosan Extracted from Shrimp Exoskeleton, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 16 (10), pp.1446–1451.
26. Wang, S. L. et al (2008). Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource Technology*, 99, 4386–4393.
27. Yu et al (1998). Methods for the assay of 1,5-anhydro fructose and beta-1-4-glucan. *C. Research* 305, 73-82.
28. Zouhour Limam et al (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties. *African Journal of Biotechnology Vol. 10 (4)*, pp. 640-647.