

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CHỨC NĂNG CỦA CHITOSAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP TẠO RA TỪ CHITOSAN THÔNG THƯỜNG

Phạm Thị Phương*, Nguyễn Văn Bình, Lưu Hồng Sơn, Vũ Thị Mai
Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là tổng hợp và đánh giá một số tính chất chức năng của chitosan khối lượng phân tử thấp (CTSLMW) tạo ra từ chitosan thông thường. Chitosan khối lượng phân tử thấp được tổng hợp theo phương pháp của Liu et al, (2006) sau các khoảng thời gian thủy phân khác nhau thu được chitosan có khối lượng phân tử dao động từ 9,5 - 10,4 kDa, mức độ diacetyl hóa thay đổi không đáng kể khoảng $97 \pm 0,5\%$. Các màng tạo ra từ CTSLMW đều có tính tan và tính hút ẩm lớn hơn 50%, chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có tính tan và tính hút ẩm thấp nhất. Chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có khả năng kháng nấm mốc *Penicillium expansum* (*P. expansum*) tốt nhất (nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* là 0,5% trên môi trường lỏng và 1% trên môi trường rắn). Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian kháng nấm mốc *P. expansum* cho thấy chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có thời gian xử lý ngắn nhất là 22 giờ, ở nồng độ ức chế tối thiểu thấp nhất là 0,75%.

Từ khóa: chitosan, chitosan khối lượng phân tử thấp, *Penicillium expansum*, nồng độ ức chế tối thiểu, kháng khuẩn

MỞ ĐẦU

Chitosan là một polysaccharide được hình thành từ quá trình diacetyl hóa chitin. Ở nước ta việc sản xuất chitin, chitosan có nguồn gốc từ vỏ tôm, mai mực mang lại hiệu quả kinh tế cao và góp phần giải quyết ô nhiễm môi trường cho ngành chế biến thủy sản. Chitosan có khả năng kháng vi sinh vật, khả năng phân hủy sinh học và không độc được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như, công nghiệp, y tế, chế biến và bảo quản nông sản [8].

Chitosan có khả năng ức chế sự phát triển của nấm mốc *Aspergillus niger* ở nồng độ 0,1 - 0,5 mg/ml, ở nồng độ 0,2 - 0,5 mg/ml chitosan có tác dụng gây ra sự rò rỉ protein và các chất hấp phụ tia uv của *Aspergillus niger*. Mặt khác chitosan nồng độ 3 - 5 mg/ml có khả năng ức chế sự phát triển của nấm mốc *Aspergillus paraciticus* và ngăn cản sự hình thành aflatoxin [9]. Theo Munoz et al (2009) [13] cho thấy chitosan có khả năng ức chế nấm mốc *Collectotrichum spp* trên cà chua và nho, có tác dụng làm giảm đáng kể tổn thương trên quả cà chua xử lý ở nồng độ 1 - 2,5%. Tác giả này cũng cho rằng việc sử dụng

chitosan cũng có hiệu quả làm giảm bệnh thán thư trên cà chua và quả mọng. Theo Rhoades & Roller (2000) [14] cho rằng nấm men bị loại bỏ hoàn toàn khi tăng thêm 0,3 g chitosan trên mỗi lít nước ép táo đóng chai tiệt trùng lưu trữ ở 7°C, số lượng vi khuẩn lactic tăng nhưng thấp hơn so với đối chứng. Chitosan ở nồng độ 0,2 - 1 g/l nước ép táo có thể ức chế sự tăng trưởng của một số vi sinh vật gây hư hỏng nước ép táo [1]. Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chitosan phụ thuộc vào khối lượng phân tử cho thấy CTSLMW được cho là có khả năng kháng khuẩn tốt hơn so với chitosan thông thường. Do CTSLMW có khả năng tan trong nước tốt hơn dẫn đến phản ứng tốt hơn với các vị trí hoạt động của vi sinh vật [7]. Kết quả nghiên cứu của Gerasimenko et al (2004) [10] cho rằng khối lượng phân tử tăng làm giảm hoạt tính kháng *E.coli* của chitosan.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Chitosan do Việt Nam sản xuất có độ diacetyl hóa DD > 85%, khối lượng phân tử khoảng 30 kDa. Nấm mốc *P. expansum* do Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

* Tel: 0962 075082, Email: phamthuphuonghb@gmail.com

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tổng hợp CTSLMW

CTSLMW được tổng hợp theo phương pháp của Liu et al (2006) [12] Cân 10 g chitosan cho vào 190 ml axit axetic 5% ủ ở 50 °C trong 25 h, 37 h, 45 h, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút, sau khi ly tâm chitosan được thêm NaOH 4M cho đến khi pH của chitosan từ 7 - 9. Rửa kết tủa bằng nước máy và làm khô ở 50 °C. Độ nhớt của chitosan được đo bằng máy đo độ nhớt. Khối lượng phân tử chitosan được tính theo công thức của Mark Houwink ($[\eta] = k \cdot M^a$), với $K = 1,64 \cdot 10^{-30}$, DD^{14} và $\alpha = -1,02 \cdot 10^{-2} + 1,82$. Mức độ diacetyl hóa của chitosan được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) theo Berth (2002) [3] $DDA = (161,1 \cdot A.V - 0,0218m)/(3,3615m - 42,1 \cdot A.V)$ (%), mức độ diacetyl hóa tính theo công thức: $DA = 100 - DDA$ (%).

Phương pháp chuẩn bị màng

Phương pháp đổ màng được tiến hành theo phương pháp của Aguirre - Loredó et al (2014) [2]. Đổ 80 ml dịch lỏng CTSLMW vào đĩa petri phi 15 và làm khô ở 50 °C trong 72 h trong tủ sấy (độ ẩm tương đối ~ 30%) sau đó màng được bóc ra khỏi đĩa petri và giữ trong bình hút ẩm có độ ẩm tương đối là $50 \pm 5\%$ ở nhiệt độ phòng 23 ± 3 °C, trong 7 ngày trước khi mô tả các tính chất của màng.

Phương pháp xác định tính tan của màng trong nước

Độ tan trong nước của màng được định nghĩa là tỷ lệ chất khô hòa tan trong nước của màng được giải phóng sau khi ngâm trong nước cất. Độ tan trong nước S của màng được xác định theo phương pháp của Aguirre - Loredó et al (2014) [2] cân các mảnh màng khô có kích thước 4 cm² sau đó ngâm trong 30 ml nước cất ở 25 °C, khuấy đều theo chu kỳ trong một giờ. Các mẫu được lọc bằng giấy lọc. Phần không tan của màng được sấy khô để xác định khối lượng cuối cùng. Độ tan được xác định bằng tỷ lệ khối lượng chất khô sau khi sấy trên khối lượng mẫu ban đầu.

Phương pháp xác định tính hút ẩm của màng

Tính hút ẩm của màng được xác định gián tiếp qua tỷ lệ phần trăm lượng nước bay hơi qua màng trên tổng lượng nước ban đầu sau một khoảng thời gian xác định.

Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu của chitosan trong môi trường lỏng

Bào tử nấm mốc *P. expansum* được thu bằng nước muối sinh lý và pha loãng tới mật độ 10⁶ bào tử/ml. Dịch chitosan ban đầu có nồng độ 2% được pha loãng trong môi trường PDB với nồng độ giảm dần 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%. Cho 5 ml chitosan ở các nồng độ trên vào các ống nghiệm, mẫu kiểm chứng chứa 2,5 ml PDB và 2,5 ml đệm acetate. Bổ sung 100 µl dịch bào tử nấm mốc vào các ống nghiệm chứa chitosan và mẫu kiểm chứng. Sau đó đem nuôi trong tủ lắc ở 30 °C trong 24 giờ. Rút 100 µl dịch trong các ống nghiệm trang đều lên đĩa thạch chứa môi trường PDA và nuôi trong tủ ẩm 30°C sau 24 - 48 h quan sát và xác định nồng độ ức chế [6].

Phương pháp xác định khả năng ức chế tối thiểu của chitosan trong môi trường rắn

Dịch bào tử nấm mốc được chuẩn bị như trên. Chitosan được pha loãng trong dung dịch axit axetic 1% ở các nồng độ 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%. Hút 100 µl dung dịch chitosan ở các nồng độ trên trang đều lên trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường PDA, để khô sau đó hút 100 µl dịch bào tử nấm mốc trang đều lên trên bề mặt thạch, nuôi trong tủ ẩm ở 30 °C sau 24 - 48 h, quan sát và xác định nồng độ ức chế [15].

Phương pháp xác định ảnh hưởng của thời gian kháng nấm mốc *P. expansum* của chitosan

Chitosan được chuẩn bị tương tự như xác định nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* trong môi trường lỏng. Các ống nghiệm chứa chitosan và bào tử nấm mốc được nuôi lắc ở 30 °C trong tủ lắc trong các khoảng thời gian 0, 14, 18, 22 và 26 giờ. Lấy 100 µl dung dịch chitosan sau các khoảng thời gian trên cấy trang trên đĩa petri chứa môi

trường PDA, nuôi trong tủ ẩm 30 °C sau 24 – 48 h quan sát và xác định nồng độ ức chế [12].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu tổng hợp CTSLMW

Kết quả xác định khối lượng phân tử và mức độ diacetyl hóa của chitosan được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Khối lượng phân tử và mức độ diacetyl hóa

Công thức	Khối lượng phân tử (kDa)	Mức độ diacetyl hóa (%)
Chitosan 25h	10,4	97,53
Chitosan 37h	9,9	97,27
Chitosan 45h	9,5	96,84

Tất cả các mẫu chitosan tạo ra đều có màu trắng ngà, có khối lượng phân tử dao động từ 9,5 đến 10,4 kDa và mức độ diacetyl hóa của chitosan thay đổi không đáng kể khoảng (97 ± 0,5%). Kết quả phù hợp với kết quả của Chen et al (2002) [4].

Nghiên cứu tính tan và tính hút ẩm của màng

Tính tan của màng là một đặc tính quan trọng của màng sinh học trong thực phẩm, nó quyết định sự phân hủy sinh học của màng. Tuy nhiên tính tan của màng trong nước cao có thể gây bất lợi cho các màng này khi sử dụng trong môi trường có độ ẩm tương đối cao [2].

Bảng 2. Tính tan và tính hút ẩm của màng

Khối lượng phân tử (kDa)	Tính tan (%)	Tính hút ẩm (%)
10,4	75	75,4
9,9	66	79,8
9,5	60	83,5

Kết quả bảng 2 chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có tính tan và tính hút ẩm thấp nhất do chitosan có khối lượng phân tử cao có độ nhớt cao nên màng tạo ra dày hơn do đó có tính tan và tính hút ẩm thấp hơn. Mặt khác việc khối lượng phân tử của chitosan giảm làm tăng tính linh hoạt của các phân tử chitosan trong màng, dẫn đến làm tăng tính tan trong nước của màng. Kết quả phù hợp với kết quả của Clasen et al (2006) [5].

Nghiên cứu nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW trong môi trường lỏng và môi trường rắn

Kết quả nghiên cứu nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW trên

môi trường lỏng và rắn được trình bày ở bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW trên môi trường lỏng

Khối lượng phân tử (kDa)	Nồng độ (%)			
	0,25	0,5	0,75	1
10,4	+	-	-	-
9,9	+	+	-	-
9,5	+	+	-	-

Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW trên môi trường rắn

Khối lượng phân tử (kDa)	Nồng độ (%)			
	0,25	0,5	0,75	1
10,4	+	+	+	-
9,9	+	+	+	+
9,5	+	+	+	+

“+” Xuất hiện khuẩn lạc, “-” Không xuất hiện khuẩn lạc”

Kết quả bảng 3 và 4 cho thấy chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có khả năng kháng nấm mốc *P. expansum* tốt nhất ở nồng độ ức chế tối thiểu là 0,5% trên môi trường lỏng và 1% trên môi trường rắn. Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả của Fang et al (1994) [9] cho rằng chitosan nồng độ 0,2 - 0,5 mg/ml có tác dụng gây ra sự rò rỉ protein và các chất hấp phụ tia uv của *Aspegillus niger*. Mặt khác khi khối lượng phân tử tăng làm tăng khả năng kháng nấm mốc của chitosan. Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả của Jeon et al (2001) [11] báo cáo rằng chitosan có khối lượng phân tử (1 đến 10 kDa) có hiệu quả kháng khuẩn tăng khi tăng khối lượng phân tử.

Nghiên cứu ảnh hưởng thời gian kháng nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW

Ảnh hưởng của thời gian xử lý chitosan được trình bày ở bảng 5, 6, 7.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian xử lý chitosan khối lượng phân tử 10,4 kDa lên chủng nấm mốc *P. expansum*

Thời gian (h)	Nồng độ (%)			
	0,25	0,5	0,75	1
0	+	+	+	+
14	+	+	+	+
18	+	+	+	+
22	+	+	-	-
26	+	+	-	-

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian xử lý chitosan khối lượng phân tử 9,9 kDa đến chủng nấm mốc *P. expansum*

Thời gian (h)	Nồng độ (%)			
	0,25	0,5	0,75	1
0	+	+	+	+
14	+	+	+	+
18	+	+	+	+
22	+	+	+	-
26	+	+	-	-

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian xử lý chitosan khối lượng phân tử 9,5 kDa đến chủng nấm mốc *P. expansum*

Thời gian (h)	Nồng độ (%)			
	0,25	0,5	0,75	1
0	+	+	+	+
14	+	+	+	+
18	+	+	+	+
22	+	+	+	+
26	+	+	-	-

“+” Xuất hiện khuẩn lạc, “-” Không xuất hiện khuẩn lạc

Từ kết quả bảng 5, 6, 7 cho thấy chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có thời gian kháng nấm mốc *P. expansum* ngắn nhất là 22 giờ, nồng độ ức chế tối thiểu thấp nhất là 0,75%. Thời gian xử lý tăng làm tăng khả năng kháng nấm mốc của chitosan điều này có thể là do khi tăng thời gian xử lý đến một mức nhất định đủ để quá trình hấp thụ chitosan lên tế bào nấm mốc đạt trạng thái cân bằng, ổn định khi đó tế bào nấm mốc bị tổn thương nhiều nhất. Lực liên kết mạnh giữa chitosan và tế bào có thể dẫn đến phá vỡ màng tế bào hoặc có thể lấy đi những ion kim loại cần thiết cho hoạt động trao đổi chất dẫn đến rối loạn trong quá trình trao đổi chất của tế bào vi sinh vật [5] hoặc chitosan thẩm thấu qua màng tế bào, chúng dễ dàng tương tác với các nhóm phosphoryl của thành phần phospholipid tế bào làm cho tế bào mới tạo thành không có màng hoặc màng tế bào tạo thành rất mỏng gây nên sự rò rỉ các hợp chất nội bào [9].

KẾT LUẬN

CTSLMW được tổng hợp theo phương pháp của Liu et al (2006) [12] có khối lượng phân tử dao động từ 9,5 đến 10,4 kDa, mức độ

deacetyl hóa thay đổi không đáng kể khoảng $97 \pm 0,5\%$. Chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có tính tan và tính hút ẩm thấp nhất, khả năng kháng tốt nhất đối với nấm mốc *P. expansum* ở cả môi trường nuôi cấy rắn và môi trường nuôi cấy lỏng (nồng độ ức chế tối thiểu trên môi trường lỏng là 0,5% và 1% trên môi trường rắn). Nghiên cứu ảnh hưởng thời gian kháng nấm mốc *P. expansum* của CTSLMW trong môi trường lỏng cho thấy chitosan có khối lượng phân tử 10,4 kDa có khả năng kháng nấm mốc tốt nhất trong khoảng thời gian xử lý 22 giờ, ở nồng độ 0,75%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abd A. J., Niamah A. K. (2012), “Effect of chitosan on apple juice quality”, *International Journal of Agricultural and Food Science*, 2, pp. 153-157.
2. Aguirre - Loredó R. Y., Rodríguez-Hernández and Chavarría-Hernández (2014), “Physical properties of emulsified films based on chitosan and oleic acid”, *CyTA - Journal of Food*, 12(4), pp. 304 - 312.
3. Berth G., Dautzenberg H. (2002), “The degree of diacetylation of chitosans its effect on the chain conformation in aqueous solution”, *Carbohydrate Polymers*, 47, pp. 39 -51.
4. Chen X. G., Zheng L., Wang Z., Lee C. Y., & Park H. J. (2002), “Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 5915-5918.
5. Clasen C., Wilhelms T., Kulicke M. K. (2006), “Formation and characterization of chitosan membranes”, *Biomacromolecules*, 7, pp. 3210-3222.
6. Tran Bang Diep, Nguyen Duy Lam, Tran Minh Quynh and Tamikazu Kume (2005), “Radiation - induced enhancement of antifungal activity of chitosan on fruit - spoiling fungi during postharvest storage” *Jeari - conf. 2001 - 2005*, pp. 17 - 26.
7. Dutta P. K., Tripathi S., Mehrotra G. K., and Dutta J. (2009), “Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications”, *Food Chemistry*, 114(4), pp. 1173-1182.
8. Elsabee M. Z., Naguib H. F., Morsi R. E. (2012), “Chitosan based nanofibers”, *Materials Science and Engineering C*, 32, pp. 1711-1726.
9. Fang S. W., Li C. F., and Shih D. Y. C. (1994), “Antifungal activity of chitosan and its preservative

effect on low-sugar candied kumquat”, *Journal of food protection*, 56, pp. 136 - 140.

10. Gerasimenko D. V., Avdienko I. D. (2004), “Antibacterial effects of water - soluble low - molecular weight chitosans on different microorganisms”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, pp. 253 – 257.

11. Jeon Y. J., Park P. J., Kim S. K. (2001), “Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate polymer*, 44(1), pp. 71 - 76.

12. Liu N., Chen X. G., Park H. J., Liu C. G., Liu C. S., Meng X. H., Yu L. J. (2006), “Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*”, *Carbohydrate Polymer*, 64, pp. 60-65.

13. Munoz Z., Moret A. and Garces (2009), “Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* spp. on tomatoes and grapes”. *Crop Protection*, 28, pp. 36 – 40.

14. Rhoades J., Roller S. (2000), “Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods”, *Application Environment Microbiology*, 66, pp. 80-86.

15. Singburadom N., Onuma P., Tida D. (2011), “Antimicrobial Activity of different molecular weight chitosans to inhibit some important plant pathogenic fungi”, *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*, 45, pp. 644 – 655.

SUMMARY

STUDY ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF CHITOSAN LOW MOLECULAR WEIGHT FORMED FROM NATIVE CHITOSAN

Phạm Thị Phương*, Nguyen Van Binh, Luu Hong Son, Vu Thi Mai
University of Agriculture and Forestry - TNU

The purpose of this study was to synthesize and investigate some of the functional properties of chitosan low molecular weight (CTSLMW) forming from native chitosan. Chitosan low molecular weight was synthesized under Liu et al (2006) method, after different hydrolysis periods of time chitosans had molecular weight ranging from 9.5 to 10.4 kDa, deacetylation degree changing insignificantly at $97 \pm 0.5\%$. Films forming from CTSLMW have water solubility and water vapour permeability at over 50% and chitosan with molecular weight 10,4 kDa has the lowest water solubility and water vapour permeability. Chitosan with molecular weight 10.4 kDa has the best inhibited *Penicillium expansum* (*P. expansum*) growth at concentration of 0.5% in liquid medium and 1% in solid medium. Study on the effect of time inhibition on *P. expansum* mold showed that chitosan with molecular weight 10.4 kDa has the shortest processing time of 22 hours at minimum inhibitory concentration of 0.75%.

Keywords: *chitosan, chitosan low molecular weight, Penicillium expansum, minimum inhibitory concentration, antibacterial.*

Ngày nhận bài: 22/6/2017; Ngày phản biện: 06/7/2017; Ngày duyệt đăng: 31/7/2017

* Tel: 0962 075082, Email: phamthuphuonghb@gmail.com