

ĐIỀU CHẾ OLIGO-CHITOSAN VÀ ỨNG DỤNG LÀM CHẤT KÍCH THÍCH NẤY MẦM HẠT LÚA

Trần Xuân Mậu

Khoa Hóa học, Trường Đại học khoa học Huế

Email: txmau58txmau5859@yahoo.com.vn

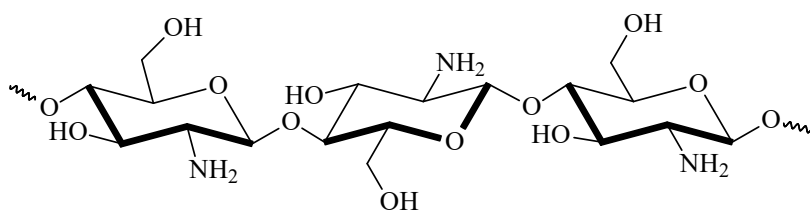
TÓM TẮT

Oligo-chitosan được điều chế bằng cách cắt mạch chitosan bằng H_2O_2 . Các yếu tố tác động lên quá trình cắt mạch là nhiệt độ, nồng độ H_2O_2 và thời gian phản ứng. Hàm mục tiêu là phân tử lượng (M) và độ deacetyl hóa (DD) của oligo-chitosan. Phân tử lượng của oligo-chitosan phụ thuộc nhiều vào điều kiện phản ứng và đạt giá trị trong khoảng từ 3000 đến 30414 Da. Độ deacetyl hóa của chitosan giảm từ 86% xuống 65% trong phản ứng. Oligo-chitosan với phân tử lượng 30414 Da và độ deacetyl hóa 78% có tác dụng kích thích nảy mầm hạt lúa ở nồng độ 0,005% trong dung dịch acid acetic 0,1%.

Từ khóa: độ deacetyl hóa, hạt lúa, kích thích sinh trưởng, oligo-chitosan, phân tử lượng.

1. MỞ ĐẦU

Chitosan là một trong những dẫn xuất quan trọng nhất của chitin, một polymer thiên nhiên với trữ lượng lớn đứng thứ hai sau cellulose. Sản lượng chitosan trên thế giới vào thập niên cuối của thế kỷ 20 là khoảng 2000 tấn/năm [1]. Chitosan có thể bị thủy phân tạo nên chitosan có phân tử lượng thấp hơn gọi là oligo-chitosan. Oligo-chitosan có tính chất đặc trưng là chống lại các vi sinh vật có hại, vi khuẩn...[17]. Trên Hình 1 là công thức cấu tạo của chitosan.



Hình 1. Công thức cấu tạo của chitosan

Được biết đến với hoạt tính kháng khuẩn, miễn dịch, oligo-chitosan được ghi nhận là có hiệu ứng chống sự xâm nhiễm của nhiều loại nấm gây bệnh thực vật thông qua cơ chế tự tạo kháng sinh (phytoalexin). Chức năng của oligo-chitosan không chỉ phụ thuộc vào cấu trúc hóa học mà còn phụ thuộc vào kích thước phân tử. Những hợp chất này thể hiện độc tính và cản trở sự hình thành và phát triển của nấm mốc [13, 18, 20, 21], tác dụng chống lại vi rút [3, 4, 11], vi khuẩn và các côn trùng có hại khác [8, 10, 13]. Các sản phẩm này được sử dụng theo nhiều cách để giảm mức độ nhiễm bệnh và hạn chế sự phát triển và lan tràn mầm bệnh và do đó nâng cao

năng suất và chất lượng cây trồng [6]. Sự thành công phụ thuộc vào loại bệnh, nồng độ áp dụng, độ deacetyl hóa, độ nhớt và cách thức áp dụng như kích thích nảy mầm [5, 16, 22], phun lên lá [2, 9, 15], cải tạo đất [11], sử dụng một mình hay kết hợp với các biện pháp khác.

Trong nghiên cứu này, oligo-chitosan được tổng hợp bằng cách cắt mạch chitosan bằng H_2O_2 và sản phẩm được sử dụng để kích thích nảy mầm hạt lúa.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chitosan có độ deacetyl hóa 86% và phân tử lượng 186364 Da mua tại Công ty Hóa chất Hùng Tiến, Cần Thơ. Natri hydroxide 96%, acid acetic 99,5%, hydroperoxide 30%, còn tuyệt đối là hóa chất tinh khiết phân tích của Trung Quốc. Giống lúa sử dụng trong thí nghiệm có ký hiệu là XT27 do Viện cây lương thực và cây thực phẩm chọn tạo và được trồng thử nghiệm từ vụ đông xuân năm 2012 tại Thừa Thiên Huế.

2.2. Điều chế oligo-chitosan

Cân chính xác 15g mẫu chitosan cho vào cốc có mỏ dung tích 1000 ml, sau đó lấy 600 ml dung dịch CH_3COOH 2% cho vào mẫu chitosan và khuấy cho đến khi tan hết. Đưa cốc chứa chitosan vào hệ thống điều nhiệt và tiến hành phản ứng tại các nồng độ H_2O_2 1, 2, 3, 4, 5% và nhiệt độ phản ứng 40, 50, 60, 70 và 80 °C. Sau các khoảng thời gian phản ứng 2, 3, 4, 5, và 6 giờ lấy ra 100 ml dung dịch. Sử dụng dung dịch NH_3 đậm đặc để kết tủa oligo-chitosan sau đó rửa bằng nước cất đến khi nước rửa trung tính và rửa lại lần cuối bằng cồn 96°. Sấy kết tủa thu được ở nhiệt độ 40 °C. Tiến hành xác định phân tử lượng và độ deacetyl hóa của mẫu. Một số mẫu được gửi đi đặc trưng bằng IR, XRD và SEM.

2.3. Xác định phân tử lượng của oligo-chitosan

Phân tử lượng của chitosan được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt của dung dịch chitosan trong dung môi CH_3COOH 0,25 M và CH_3COONa 0,25 M ở 25 °C [26]. Độ nhớt được xác định theo phương pháp đo một lần và độ nhớt đặc trưng được tính theo công thức (1) [14].

$$[\eta] = \frac{1}{C} \cdot (2 \cdot \eta_r - 2 \cdot \ln \eta_{td})^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Phân tử lượng được xác định từ phương trình Mark - Houwink

$$[\eta] = K \cdot M_v^\alpha \quad (2)$$

với $K = 1,4 \cdot 10^{-4}$ và $\alpha = 0,83$ [19].

2.4. Xác định độ deacetyl hóa

Hòa tan 0,25 g chitosan trong dung dịch HCl rồi định mức đến 25 ml (0,1 mol/l). Sau đó lấy ra 10 ml để chuẩn độ bằng NaOH cho đến khi dung dịch có màu xanh da trời với chỉ thị

hỗn hợp methyl đỏ 0,2% và bromcrezol xanh 0,1% trong etanol tuyệt đối với tỉ lệ 1: 3 [12].

Độ deacetyl hóa được tính theo công thức (3)

$$DD \% = \frac{203.(NH_2) \%}{16 + 42.(NH_2) \%}.100 \quad (3)$$

trong
(4)

đó,

$$(NH_2) \% = \frac{0,016.(C_1V_1 - C_2V_2)}{W}.100$$

với C_1 , V_1 là nồng độ và thể tích HCl có trong dung dịch, C_2 , V_2 là nồng độ và thể tích NaOH tiêu tốn, W là khối lượng chitosan.

2.5. Đặc trưng tính chất của oligo-chitosan

Nhiễu xạ tia X (XRD) được đo trên thiết bị Brucker D8 Advance, ống phát tia X với anod bằng Cu có bước sóng λ (Cu K α) = 1,5406 Å. Phổ hồng ngoại (FTIR) của chitosan được đo trên máy FT-IR 8400S Shimadzu ở số sóng trong vùng 4000 - 400 cm⁻¹. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) được chụp trên thiết bị Hitachi S4800.

2.6. Kích thích nảy mầm hạt lúa

Hạt lúa sau khi loại bỏ hạt lép và rửa sạch được ngâm trong nước trong thời gian 24 giờ. Quá trình nảy mầm được tiến hành với 3 loạt mẫu. Ở loạt mẫu thứ nhất, hạt lúa được ngâm trong các dung dịch chitosan với nồng độ 0,05%, 0,1% và 0,15% trong dung dịch axit acetic 1% trong thời gian 3 giờ. Lấy ra rồi tiếp tục ủ hạt giống trong 6 ngày, mỗi ngày tưới nước ngày 2 lần. Loạt mẫu thứ 2 được tiến hành tương tự như loạt mẫu thứ nhất, nhưng sau khi xử lý với chitosan thì được rửa lại một lần bằng nước. Ở loạt mẫu thứ 3, nồng độ của của chitosan cũng như của CH₃COOH được giảm đi 10 lần và đem ủ lên mầm trực tiếp. Tiến hành đồng thời hai mẫu trắng là mẫu ngâm trong nước và mẫu trong dung dịch acid acetic để so sánh. Số liệu để đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của oligo-chitosan là độ cao của mầm và độ dài của rễ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều chế oligo-chitosan

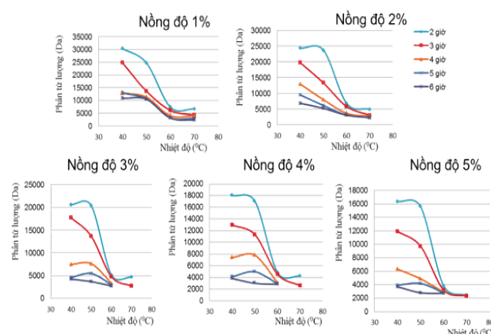
3.1.1. Phân tử lượng (M) của oligo-chitosan

3.1.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Trên hình 2 là đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa phân tử lượng của oligo-chitosan và nhiệt độ ở các nồng độ H₂O₂ và thời gian khác nhau.

Điều chế Oligo-chitosan và ứng dụng làm chất kích thích nảy mầm hạt lúa

Từ hình vẽ có thể nhận thấy rằng, khi nhiệt độ cao và thời gian phản ứng ngắn thì phân tử lượng có xu hướng giảm mạnh từ 30 kDa đến khoảng 5-7,5 kDa, nhưng khi thời gian phản ứng dài thì phân tử lượng giảm hầu như không đáng kể, từ khoảng 13 đến dưới 5 kDa, nhất là ở thời gian từ 5 – 6 giờ. Tuy nhiên, phân tử lượng ứng với 5 nồng độ trên đều có xu hướng giảm khi nhiệt độ tăng và đặc biệt là phân tử lượng giảm nhanh khi nhiệt độ tăng từ 50 đến 60 °C, khi tăng nhiệt độ lên trên 60 °C thì phân tử lượng giảm chậm lại.



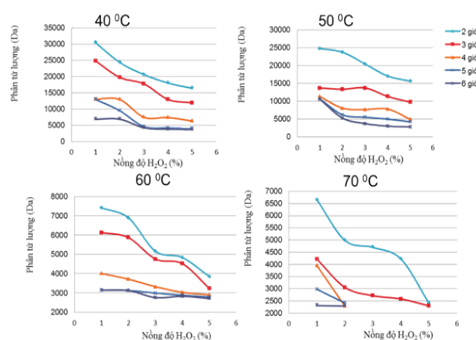
Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của phân tử lượng oligo-chitosan vào nhiệt độ cắt mạch

Phân tử lượng của oligo-chitosan giảm theo xu hướng trên là do sự phân hủy của H₂O₂ theo nhiệt độ. Ở nhiệt độ 40 và 50 °C, tốc độ phân hủy H₂O₂ thành gốc tự do còn nhỏ nên lượng gốc tự do còn ít và do đó phản ứng ít với mạch chitosan. Vì vậy, mạch chitosan chưa bị cắt nhiều. Khi nhiệt độ lên tới 60 °C thì tốc độ phân hủy tăng lên và lượng gốc tự do đạt cao nhất nên tốc độ cắt mạch là lớn nhất. Khi nhiệt độ phản ứng ở 70 °C thì hầu như toàn bộ H₂O₂ đã phân hủy hết nên phản ứng cắt mạch dừng lại và phân tử lượng của chitosan không còn giảm nữa. Vì vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình cắt mạch là 60 °C.

3.1.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂

Ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂ lên phân tử lượng được trình bày trên hình 3. Các đồ thị này biểu diễn sự phụ thuộc của phân tử lượng của oligo-chitosan vào nồng độ H₂O₂ ở các nhiệt độ và thời gian khác nhau. Từ hình vẽ có thể nhận thấy rằng: Khi nồng độ H₂O₂ càng lớn thì quá trình cắt mạch xảy ra càng mạnh, phân tử lượng giảm xuống 30414 Da và giảm đến 2284 Da. Tất cả các đồ thị đều cho thấy xu hướng giảm phân tử lượng tuyến tính theo nồng độ H₂O₂ và khi thời gian càng dài thì tốc độ giảm phân tử lượng càng nhỏ.

Có thể nhận thấy rằng khi nồng độ H₂O₂ tăng thì lượng gốc HO[•] sinh ra càng nhiều do đó các gốc HO[•] này tấn công vào các liên kết β-(1,4)-glycoside càng nhiều. Vì vậy, quá trình cắt mạch xảy ra nhanh hơn và phân tử lượng giảm mạnh. Đồng thời, khi thời gian càng dài thì mạch bị cắt nhiều hơn và khi nhiệt độ cao thì phản ứng xảy ra nhanh hơn dẫn đến phân tử lượng thấp hơn.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của phân tử lượng oligo-chitosan vào nồng độ H₂O₂

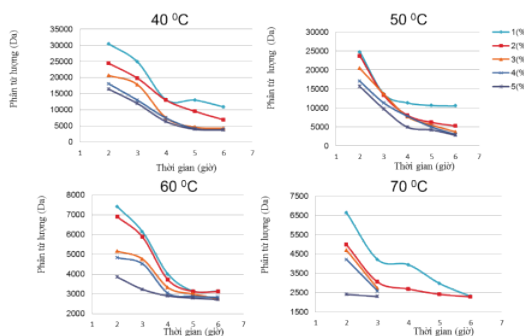
Như vậy, sự giảm phân tử lượng nói chung là tuyến tính theo nồng độ H₂O₂. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 70 °C, quá trình cắt mạch diễn ra quá sâu nên không thu được oligo-chitosan. Vì vậy,

nồng độ H_2O_2 đưa vào thích hợp nhất đó là từ 1 đến 3%.

3.1.1.3. Ảnh hưởng của thời gian

Ảnh hưởng của thời gian cắt mạch lên phân tử lượng được trình bày trên hình 4.

Từ hình vẽ có thể nhận thấy rằng khi kéo dài thời gian phản ứng thì phân tử lượng giảm. Trong khoảng thời gian đầu, từ 2 đến 4 giờ phản ứng xảy ra nhanh hơn, phân tử lượng giảm khoảng 2 lần ứng với tất cả các nồng độ H_2O_2 và nhiệt độ phản ứng. Khi thời gian càng dài, phản ứng xảy ra càng chậm lại. Ở các thí nghiệm với nồng độ H_2O_2 càng cao thì tốc độ cắt mạch càng giảm.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của phân tử lượng oligo-chitosan vào thời gian cắt mạch

Xu hướng giảm phân tử lượng như trình bày ở trên đều do nồng độ H_2O_2 trong hỗn hợp phản ứng quyết định. Ở cùng một nồng độ H_2O_2 và nhiệt độ xác định thì lượng gốc OH sinh ra tương tác với chitosan và cắt liên kết β -1,4-glycoside. Khi kéo dài thời gian phản ứng (cho tới 4 giờ) thì sự tương tác càng nhiều và mạch bị cắt càng nhiều và làm cho phân tử lượng giảm. Sau 4 giờ, lượng H_2O_2 tiêu hao gần hết nên phản ứng cắt mạch diễn ra chậm lại và dừng hẳn. Khi nồng độ H_2O_2 cao thì sự cắt mạch xảy ra ngay từ đầu khi phản ứng mới xảy ra được 1 giờ và về sau, khi kéo dài thời gian cho tới 6 giờ thì mạch không còn bị cắt nhiều nữa, nhất là khi nhiệt độ phản ứng cao. Lúc đó H_2O_2 đã phân hủy hầu như hoàn toàn. Thời gian phản ứng thích hợp là khoảng 4 giờ.

Như vậy, từ những kết quả thu được ta thấy rằng, mạch phân tử chitosan đã được cắt đến khối lượng phân tử thấp hơn để tạo oligo-chitosan. Khối lượng phân tử của oligo-chitosan điều chế được nằm trong khoảng từ 2283 - 30414 Da. Khối lượng phân tử chitosan sau khi cắt mạch giảm dần khi nhiệt độ, nồng độ H_2O_2 và thời gian tăng dần. Điều kiện cắt mạch thích hợp là: nhiệt độ 60 °C, nồng độ H_2O_2 3% và thời gian 4 giờ.

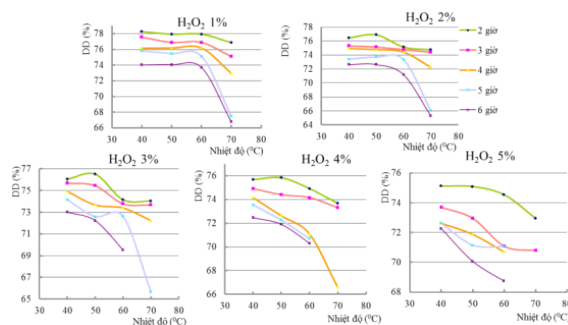
3.1.2. Độ deacetyl hóa (DD) của oligo-chitosan

3.1.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Sự phụ thuộc độ deacetyl hóa của oligo-chitosan vào nhiệt độ ở các nồng độ H_2O_2 khác nhau được trình bày trên hình 5. Từ hình vẽ có thể nhận thấy rằng DD giảm nhẹ theo nhiệt độ, khoảng 1 đến 2 đơn vị từ 78 đến 76% ở các nồng độ và thời gian phản ứng trừ khi tăng nhiệt độ lên 70 °C và chỉ giảm mạnh, tới khoảng 66 – 76% khi thời gian cắt mạch dài (5 – 6 giờ).

Như ta đã biết, phản ứng cắt mạch xảy ra trong môi trường acid acetic nên có thể xảy ra phản ứng reacetyl hóa làm tăng hàm lượng nhóm $-COCH_3$ khi phản ứng xảy ra ở nhiệt độ cao

và thời gian dài. Qua kết quả có thể thấy nhiệt độ phản ứng nên nằm trong khoảng 40 – 60 °C là phù hợp để duy trì độ deacetyl hóa ở mức cao.



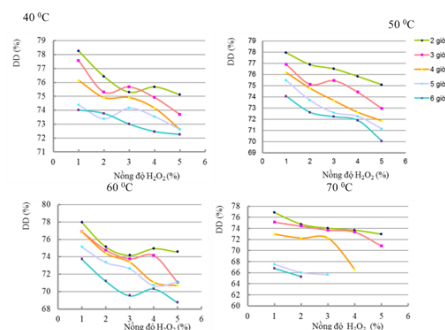
Hình 5. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc độ deacetyl hóa của oligo-chitosan vào nhiệt độ cắt mạch

3.1.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂

Ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂ lên độ deacetyl hóa được trình bày trên hình 6.

Từ đồ thị có thể nhận thấy rằng H₂O₂ góp phần làm giảm độ deacetyl hóa của oligo-chitosan từ 78% đến 68%. Tuy nhiên, ảnh hưởng của H₂O₂ lớn hơn ảnh hưởng của nhiệt độ, đặc biệt ở nồng độ cao. Ở nồng độ H₂O₂ 1%, độ deacetyl hóa chỉ giảm khoảng 4 đơn vị từ 78% xuống 74% trừ trường hợp thời gian phản ứng quá dài và nhiệt độ cao, khi đó độ deacetyl hóa giảm xuống 66%.

Có thể lý giải hiện tượng này như sau. Khi hàm lượng H₂O₂ lớn thì ion H⁺ sinh ra càng nhiều và làm cân bằng $CH_3COO^- + H^+ \rightleftharpoons CH_3COOH$ chuyển dịch về phía tạo ra CH₃COOH tức là làm cho nồng độ CH₃COOH tăng lên nên nó thúc đẩy phản ứng reacetyl hóa. Vì vậy, để duy trì độ deacetyl hóa ở mức cao, nên sử dụng H₂O₂ ở nồng độ 1% cho quá trình cắt mạch.



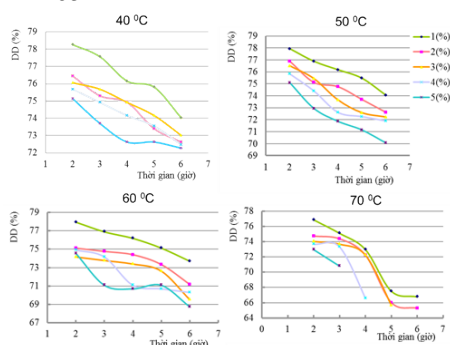
Hình 6. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc độ deacetyl hóa của oligo-chitosan vào nồng độ H₂O₂

3.1.2.3. Ảnh hưởng của thời gian

Sự phụ thuộc của độ deacetyl hóa vào thời gian phản ứng được trình bày trên hình 7.

Kết quả cho thấy rằng khi thời gian phản ứng kéo dài thì sự tiếp xúc của các trung tâm phản ứng tăng lên nên khả năng reacetyl hóa xảy ra nhiều hơn. Ảnh hưởng của thời gian lên độ deacetyl hóa cũng có xu hướng tương tự như ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂. Khi thời gian cắt mạch ngắn (2 giờ) thì độ deacetyl hóa chỉ giảm từ 78% đối với nồng độ H₂O₂ 1% tới 75% khi nồng độ H₂O₂ 5%. Khi kéo dài thời gian cắt mạch, tăng nồng độ H₂O₂ và nhiệt độ phản ứng thì

độ deacetyl hóa giảm mạnh. Khi giá trị của các thông số này ở mức cao (6 giờ, 5% và 70 °C) thì độ deacetyl hóa giảm xuống còn 65%.



Hình 7. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc độ deacetyl hóa của oligo-chitosan vào thời gian

Như vậy, độ deacetyl hóa của các mẫu oligo-chitosan đo được nằm trong khoảng 65 - 85% thấp hơn so với mẫu chitosan gốc ($DD = 86\%$) và DD giảm dần dần theo nhiệt độ, nồng độ H_2O_2 và thời gian cắt mạch.

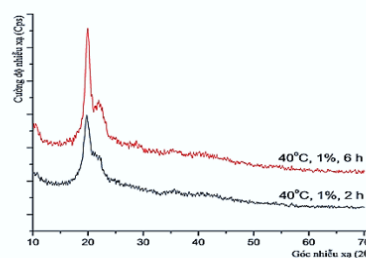
3.2. Đặc trưng sản phẩm oligo-chitosan

3.2.1. Đặc trưng bằng XRD

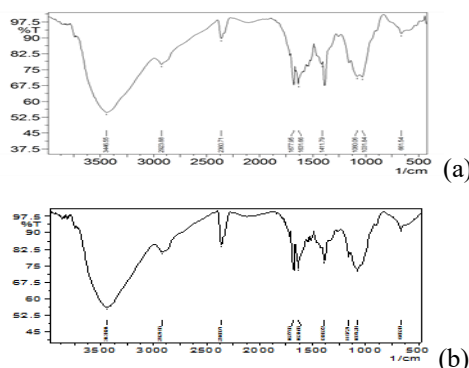
Để tìm hiểu cấu trúc tinh thể của oligo-chitosan, chúng tôi tiến hành ghi giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của các mẫu 40 °C, 1%, 2 giờ ($M = 30414$ Da) và 40 °C, 1%, 6 giờ ($M = 10872$ Da). Giản đồ nhiễu xạ được đo trong khoảng 2θ từ 10 đến 70°. Kết quả trình bày ở hình 8 cho thấy 2 mẫu chitosan đo được có 2 peak mạnh $10,5^\circ$ và 20° . Điều này chứng tỏ chitosan thu được có cấu trúc tinh thể.

3.2.2. Đặc trưng bằng phổ IR

Trên hình 9 là phổ hồng ngoại với các peak đặc trưng của chitosan 2 mẫu 40 °C, 5%, 2h ($M = 16378$ Da) và mẫu 50 °C, 5%, 3h ($M = 9721$ Da). Cả 2 phổ đều có các peak đặc trưng ở vùng 3450 cm^{-1} ứng với dao động ν_{OH} của alcol tự do, peak 2921 và 2923 cm^{-1} ứng với dao động $-CH-$ của methyl và peak 1633 cm^{-1} tương ứng với dao động ν_{NHCOR} của nhóm NHCOR; trên cả hai phổ đều xuất hiện peak ứng với dao động của nhóm $-NH_2$ ở 1778 cm^{-1} của chitosan.



Hình 8. Giản đồ nhiễu xạ XRD của các mẫu oligochitosan

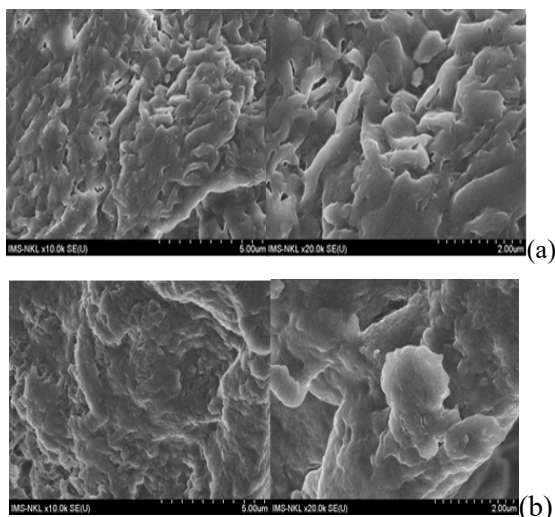


Hình 9. Phổ IR của mẫu oligo-chitosan
a) 40 °C, 5%, 2 giờ; b) 50 °C, 5%, 3 giờ

3.2.3. Đặc trưng bằng ảnh SEM

Để quan sát hình thái và bề mặt của sản phẩm, chúng tôi tiến hành chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM). Kết quả được trình bày ở hình 10.

Hình ảnh SEM của 2 mẫu chitosan cho thấy oligo-chitosan có cấu trúc dạng lớp, đó là từng lớp polymer, bề mặt không nhẵn, hạt có hình dạng không xác định, các lớp có kích thước lớn hơn 2 μm và xếp khít chồng lên nhau. Từ những kết quả thu được ở trên ta thấy bề mặt của 2 mẫu sản phẩm có khối lượng phân tử khác nhau, mẫu 40 °C, 1%, 2 giờ ($M = 30414$ Da), mẫu 40 °C, 1%, 6 giờ ($M = 10872$ Da) đều có hình dạng giống với kết quả về SEM bề mặt của chitosan được công bố trong các tài liệu trước đây [12, 20].



Hình 10. Ảnh SEM của mẫu oligo-chitosan
a) 40 °C, 1%, 2 giờ; b) 40 °C, 1%, 6 giờ

3.3. Ứng dụng oligo-chitosan để kích thích nảy mầm hạt lúa

Như đã trình bày trong phần thực nghiệm, mỗi loạt mẫu sử dụng 5 loại chitosan với phân tử lượng và DD khác nhau. Ký hiệu mẫu được trình bày trong bảng 3.1.

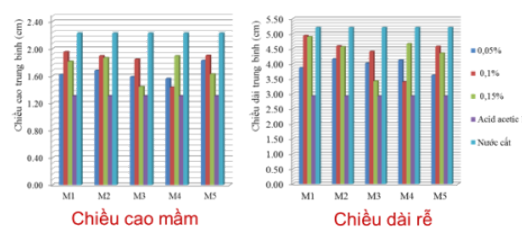
Mỗi mẫu được pha ở 3 nồng độ khác nhau và thực hiện với 2 mẫu trắng, một mẫu là axit CH_3COOH và một mẫu là nước cất. Tiến hành đo kích thước của mầm và rễ sau đó lấy giá trị trung bình và tính tỉ lệ nảy mầm.

3.3.1. Kết quả đối với loạt mẫu thứ I

Kết quả cho thấy tỉ lệ nảy mầm các mẫu ngâm trong dung dịch chitosan ở các nồng độ khác nhau tuy cao hơn so với mẫu ngâm trong dung dịch acid nhưng đều thấp hơn so với mẫu ngâm trong nước. Tuy nhiên, ở mỗi nồng độ thì tỉ lệ nảy mầm lại khác nhau. Ở mẫu có DD cao thì tỉ lệ nảy mầm tốt hơn. Điều này cho thấy tỉ lệ nảy mầm phụ thuộc vào DD, nồng độ chitosan và pH của dung dịch.

Bảng 3.1. Bảng DD và phân tử lượng (M) của 5 mẫu chitosan

Stt	Kí hiệu	M (Da)	DD (%)
1	M1	30414	78
2	M2	13060	76
3	M3	10872	74
4	M4	13680	75
5	M5	5490	73



Hình 11. Biểu đồ kích thước mầm và rễ của loạt mẫu thứ I

Kích thước trung bình của mầm và rễ của các mẫu được mô tả trên các biểu đồ hình 11.

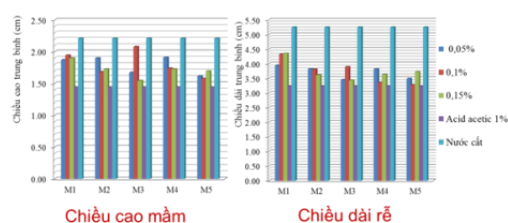
Sau khi ngâm trong dung dịch chitosan thì môi trường acid có trong dung dịch chitosan sẽ làm cho hạt lúa nảy mầm chậm hơn, kích thước mầm và rễ nhỏ hơn so với mẫu trắng là nước cất (có môi trường trung tính). Tuy nhiên, khi hạt lúa ngâm trong môi trường acid thì chiều cao của mầm và chiều dài của rễ đều nhỏ hơn nhiều so với hạt giống ngâm trong dung dịch chitosan. Điều này cho thấy chitosan cũng đã thể hiện được khả năng kích thích nảy mầm trên hạt giống.

3.3.2. Kết quả đối với loạt mẫu thứ II

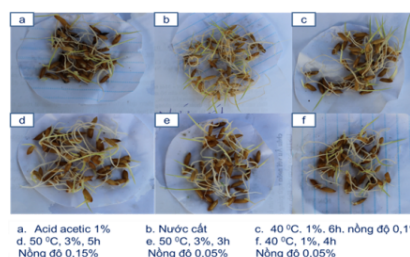
Kết quả cho thấy tỉ lệ nảy mầm các mẫu ngâm trong dung dịch chitosan cũng tương tự như các mẫu ở loạt mẫu thứ nhất. Ở các nồng độ khác nhau tuy tỉ lệ nảy mầm cao hơn so với mẫu acid nhưng đều thấp hơn so với mẫu nước. Tỉ lệ nảy mầm phụ thuộc vào DD, nồng độ chitosan và pH của dung dịch.

Kích thước trung bình của mầm và rễ của các mẫu được mô tả trên các biểu đồ hình 12. Từ biểu đồ ta thấy có sự chênh lệch về trung bình chiều cao mầm và chiều dài rễ của hạt giống ở các nồng độ chitosan khác nhau. Tuy nhiên, sự chênh lệch này không đáng kể và kết quả tuy cao hơn mẫu xử lý acid nhưng đều thấp hơn mẫu xử lý trong nước. Hạt giống sau khi ngâm được rửa sạch qua bằng nước cất thì kết quả không khả quan hơn so với loạt mẫu thứ nhất. Điều này cho thấy, nồng độ acid trong dung dịch chitosan cũng ảnh hưởng lớn đến quá trình nảy mầm của hạt giống lúa.

Trên hình 13 là một số hình ảnh mẫu hạt giống được xử lý trong nước, acid và trong các dung dịch chitosan khác nhau.



Hình 12. Biểu đồ kích thước mầm và rễ của loạt mẫu thứ II



Hình 13. Hình ảnh mầm lúa của loạt mẫu thứ II

Để đánh giá sự khác biệt về chiều cao mầm và chiều dài rễ, chúng tôi tiến hành kiểm định thống kê bằng cách so sánh cặp đối với 5 mẫu chitosan ở cùng một nồng độ và đối với từng mẫu ở 3 nồng độ khác nhau, đồng thời so sánh với mẫu xử lý bằng nước và bằng dung dịch acid acetic. Mức ý nghĩa là $\alpha = 0,05$. Kích thước mẫu là 18.

Đối với loạt mẫu thứ II, nói chung là không tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chiều cao mầm và độ dài rễ giữa các mẫu chitosan ở nồng độ 0,05% và 0,15%. Riêng ở các mẫu với nồng độ 0,10% thì có sự khác biệt nhỏ giữa mẫu M3 và mẫu M5 về chiều cao mầm. Ở 3 cặp mẫu M1 – M4, M1 – M5 và M3 – M5 có sự khác biệt thống kê về độ dài rễ.

Tuy nhiên, các số liệu này là quá ít để có thể khẳng định các mẫu chitosan có ảnh hưởng tới kích thước của mầm và rễ. Khi so sánh với các mẫu xử lý bằng dung dịch acid acetic thì không có sự khác biệt nào có ý nghĩa thống kê. Nếu so sánh với các mẫu xử lý trong nước thì

phần lớn các mẫu xử lý bằng chitosan có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê, nhưng sự sai khác lại có giá trị âm. Điều này có nghĩa là kích thước của mầm và rễ xử lý bằng nước lại lớn hơn so với khi xử lý bằng chitosan. Vì vậy, việc xử lý mẫu bằng dung dịch chitosan nồng độ 0,05; 0,10 và 0,15% trong dung dịch acid acetic 1% và rửa lại bằng nước tỏ ra không có ý nghĩa về mặt thực tế. Những mẫu có sự khác biệt về mặt thống kê có giá trị p nhỏ hơn 0,05.

3.3.3. Kết quả đối với loạt mẫu thứ III

Kích thước trung bình của mầm và rễ của các mẫu được mô tả trên các biểu đồ hình 14.

Từ biểu đồ ta thấy rằng, khi pha loãng acid và dung dịch chitosan thì pH của dung dịch chitosan tăng lên do đó hạt giống lúa nảy mầm tốt hơn so với loạt mẫu thứ nhất và loạt mẫu thứ hai. Điều này được thể hiện ở chiều cao mầm và chiều dài rễ lớn hơn rất nhiều so với các mẫu đo được ở loạt mẫu thứ nhất và thứ hai.

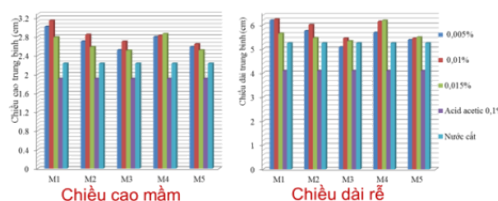
Kích thước mầm và rễ của các mẫu ngâm trong chitosan ở loạt mẫu thứ ba cao hơn cả mẫu nước và cao hơn hẳn so với mẫu acid đã pha loãng. Bên cạnh đó, mẫu M1 ($DD = 78\%$, $M = 30414$ Da); M4 ($DD = 75\%$, $M = 13680$ Da) có kết quả tốt hơn so với các mẫu khác có DD và M thấp hơn. Ngoài ra, kích thước mầm và rễ của các mẫu có nồng độ 0,01% được cải thiện hơn hẳn so với các nồng độ còn lại.

Điều này cho phép giả thiết rằng, hạt giống được ngâm trong những mẫu chitosan có DD cao (75 – 78%) và M trong khoảng 14 - 30kDa có khả năng kích thích hạt giống nảy mầm tốt hơn những mẫu còn lại.

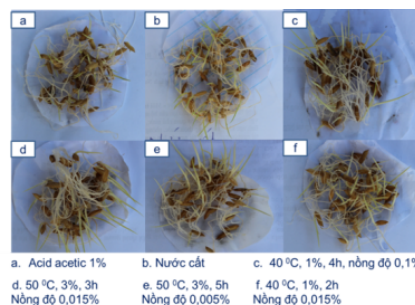
Trên hình 15 là một số hình ảnh mẫu hạt giống được xử lý trong nước, acid và trong các dung dịch chitosan khác nhau.

Tương tự như đối với loạt mẫu thứ II, để đánh giá đúng ảnh hưởng của các mẫu chitosan và nồng độ của chúng trong dung dịch lên kích thước của mầm và rễ, chúng tôi cũng sử dụng phương pháp thống kê. Mức ý nghĩa được chọn ở đây cũng là $\alpha = 0,05$ và kích thước mẫu là 30.

Khi so sánh tác động của các mẫu chitosan thì qua kết quả phân tích chúng tôi nhận thấy tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các cặp mẫu M1 – M3 và M1 – M5 ở kích thước mầm và rễ đối với tất cả các nồng độ chitosan. Sự khác biệt này thể hiện đồng thời ở phân tử lượng và độ deacetyl hóa của chitosan. Mẫu M1 có phân tử lượng 30414 Da và DD 78% và



Hình 14. Biểu đồ kích thước mầm và rễ của loạt mẫu thứ III



Hình 15. Hình ảnh mầm lúa của loạt mẫu thứ III

mẫu M5 có phân tử lượng 5490 và DD 73%. Đây là hai mẫu có phân tử lượng và DD lớn nhất và nhỏ nhất.

Khi so sánh các mẫu xử lý trong chitosan và mẫu xử lý trong nước và dung dịch acid acetic thì hầu như đều tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mẫu xử lý trong chitosan cho kích thước mầm và rễ lớn hơn nhiều so với xử lý trong nước và trong dung dịch acid acetic. Độ lệch d đều lớn hơn 0.

Từ các kết quả nêu trên có thể kết luận rằng chitosan với phân tử lượng và độ deacetyl hóa khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên kích thước mầm và rễ mầm đối với hạt lúa.

Đồng thời, chúng tôi cũng kiểm định ảnh hưởng của nồng độ chitosan đối với từng mẫu. Kết quả xử lý thống kê được trình bày trong bảng 3.16.

Kết quả cho thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê về độ cao của mầm khi thay đổi nồng độ chitosan đối với mẫu M1 và 2 mẫu có sự khác biệt về độ dài rễ (mẫu M2 và M4). Mẫu M1 là mẫu có phân tử lượng và độ deacetyl hóa lớn nhất (30414 Da và 78%). Khi so sánh cặp, độ lệch d có giá trị dương nên có thể kết luận rằng nồng độ chitosan nhỏ hơn cho mầm và rễ dài hơn.

Từ kết quả phân tích thống kê đối với loạt mẫu thử thứ III có thể kết luận rằng mẫu M1 với phân tử lượng 30414 Da và độ deacetyl hóa 78% có khả năng kích thích nảy mầm ở nồng độ 0,005% trong dung dịch acid acetic 0,1%.

4. KẾT LUẬN

Đã điều chế được oligo-chitosan có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 2283 đến 30414 Da trong điều kiện phòng thí nghiệm. Oligo-chitosan với phân tử lượng 30414 Da và độ deacetyl hóa 78% ở nồng độ 0,005% trong dung dịch acid acetic 0,1% có khả năng kích thích nảy mầm hạt lúa.

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn sự tài trợ của đề tài cấp ĐH Huế mã số DHH 2012-01-22 cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Quốc Hiến, Lê Hải, Lê Quang Luân, Trương Thị Hạnh, Phạm Thị Lệ Hà (2000). *Nghiên cứu chế tạo oligochitosan bằng kỹ thuật bức xạ*, Tạp chí Hóa học, T. 38, số 2, Tr. 22-24.
- [2]. Bittelli M., Flury M., Campbell G. S., Nichols E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agric Forest Meteorol.*, 107, pp.167-175.

- [3]. Chirkov S. N. (2002). The antiviral activity of chitosan (review), *Appl Biochem Microbiol.*, 38, pp.1–8.
- [4]. Faoro F., Sant S., Iriti M., Appiano A. (2001). Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. In: Muzzarelli R. A. A., editor. *Chitin Enzymology*. Atec; Grottammare, Italy, (2001), pp.57–62.
- [5]. Guan Y. J., Hu J., Wang X. J., Shao C. X. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 10, pp.427–433].
- [6]. Hadrami A. E., Adam L. R., Hadrami I. E., Daayf F. (2010). Chitosan in plant protection, *Mar Drugs*, 8, 4, pp.968-987.
- [7]. Hadwiger, L. A.; S. J. Klosterman, J. J. Choi (2002). The mode of action of chitosan and its oligomers in inducing plant promoters and developing disease resistance in plants, In: K.Suchiva, S. Chandkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (Eds.), *Advances in Chitin Science*, Vol. 5, pp.452–457.
- [8]. Jia Z., Shen D., Xu W. (2001). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res.*, 333, pp.1–6.
- [9]. Khan W., Prithviraj B., Smith D. L. (2002). Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynth Res.*, 40, pp.621–624.
- [10]. Kim J. H., Shin J. H., Lee H. J., Chung I.S., Lee H. J. (1997). Effect of chitosan on indirubin production from suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *J. Ferm Bioeng.*, 83, pp.206–208.
- [11]. Kulikov S.N., Chirkov S.N., Il'ina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P. (2006). Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prik. Biokhim. Mikrobiol.*, 42(2), pp.224–228.
- [12]. Lu S., Song X., Cao D., Chen Y., Yao K. (2004). Preparation of Water - Soluble Chitosan, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 91, pp.3497 – 3503.
- [13]. Muzzarelli R. A. A., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P.E. (1990). Antimicrobial properties of *N*-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother.*, 34, pp.2019–2023.
- [14]. Pamies R., Hernandez C. J. G., Lopez M. M. C., Garcia T. J. (2008) Determination of intrinsic viscosities of macromolecules and nanoparticles. Comparison of single-point and dilution procedure. *Colloid Polym. Sci.* 286, pp.1223-1231
- [15]. Rabea E. I., El Badawy M. T., Stevens C. V., Smaghe G., Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, pp.1457–1465.
- [16]. Shao C. X., Hu J., Song W. J., Hu W. M. (2005). Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci.*, 1, pp.705–708.

- [17]. Suchada B. , Chaweewan B., Suvanasara R. (2008). Application of Chitosan in Rice Production, *Journal of Metal, Materials and Minerals*, 18, pp.47 – 52.
- [18]. Sudarshan N. R., Hoover D. G., Knorr D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.*, 6, pp.257–272.
- [19]. Tian F., Liu X., Hu K., Zhao B. (2004). Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide, *Carbohydrate Polymers*, 157, pp.31 – 37.
- [20]. Tsai G. J., Su W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 62, pp.239–243.
- [21]. Wang G. H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J. Food Prot.*, 55, pp.916–919.
- [22]. Zhou Y. G., Yang Y. D., Qi Y. G., Zhang Z. M., Wang X. J., Hu X. J. (2002). Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. *J. Peanut Sci.*, 31, pp.22–25.

PREPARATION OF OLIGO-CHITOSAN AND ITS APPLICATION AS A GERMINATING STIMULATOR FOR RICE SEEDS

Tran Xuan Mau

Department of Chemistry, Hue University of Sciences

Email: txmau58txmau5859@yahoo.com.vn

ABSTRACT

Oligo-chitosan was obtained by degradation of chitosan by H₂O₂. The factors affecting the degradation process included temperature, hydrogen peroxide concentration and reaction time. The responses were molecular weight (M) and degree of deacetylation (DD) of oligo-chitosan. Molecular weight was dependent greatly on the reaction conditions and was in the range of 3,000 to 30,414 Da. Degree of deacetylation of chitosan dropped from 86% to 65% during the reaction. Oligo-chitosan with MW 30,414 and DD 78% showed stimulating effect on rice seed germination at a concentration of 0.005% in 0.1% acetic acid solution..

Keywords: *degree of deacetylation, germination stimulator, molecular weight, oligo-chitosan, rice seed.*

