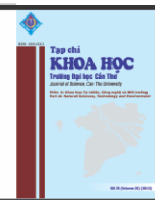




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn



MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA NANOCHITOSAN CÓ KÍCH THƯỚC NHỎ ĐƯỢC TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP TẠO GEL ION

Lê Hồ Khánh Hỷ¹, Nguyễn Thu Hồng¹, Đào Việt Hà¹, Phạm Xuân Kỳ¹, Đặng Quốc Minh¹, Phan Bảo Vy¹ và Đoàn Thị Thiết¹

¹ Phòng Hóa sinh biển, Viện Hải dương học

Thông tin chung:

Ngày nhận: 04/02/2015

Ngày chấp nhận: 24/04/2015

Title:

Certain properties of small chitosan nanoparticles synthesized by ionic gelation method

Từ khóa:

Chitosan, nanochitosan, đặc tính kháng khuẩn, kích thước nhỏ

Keywords:

Chitosan, nanoparticles, antibacterial activity, small size

ABSTRACT

This paper is concerned with certain properties of chitosan nanoparticles synthesized by ionic gelation method. These synthesized nanoparticles have an average diameter of 12 nm. Their physicochemical properties were tested by different chemical and physical analysis techniques such as FT-IR, XRD, and SEM. In addition, their antibacterial activity was also studied to evaluate the potential applications of chitosan nanoparticles.

TÓM TẮT

Bài báo này đề cập đến một số đặc tính của hạt nanochitosan được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel ion. Các hạt nanochitosan hình thành có kích thước siêu nhỏ, trung bình 12 nm. Các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan được đánh giá thông qua các kỹ thuật phân tích hóa lý khác nhau như FT-IR, XRD, SEM. Ngoài ra, đặc tính kháng khuẩn của các hạt siêu nhỏ này cũng được chúng tôi quan tâm, góp phần tìm hiểu những tiềm năng mà hạt nanochitosan mang lại.

1 GIỚI THIỆU

Chitosan là một polysaccharide mạch thẳng. Nó có nguồn gốc từ các thành phần cấu trúc vỏ các loài giáp xác như tôm, cua... Hợp chất này có khả năng hòa hợp sinh học và tự phân hủy cao (Richardson và *ctv.*, 1999). Nó có độc tính thấp, hoạt tính sinh học cao và đa dạng như kháng khuẩn, kháng nấm, tăng sinh tế bào, tăng cường khả năng miễn dịch, giảm cholesterol trong máu, hạn chế sự phát triển của khối u, có tác dụng nhanh trên các vết thương, vết bỏng (Jing và *ctv.*, 1997). Trong số các đặc tính đã nêu, hoạt tính kháng khuẩn của chitosan và các dẫn xuất của nó đối với cả vi khuẩn Gram âm (Helander và *ctv.*, 2001) và Gram dương (Bae và *ctv.*, 2006; Jeon và *ctv.*, 2001; Vishu Kumar và *ctv.*, 2004; No và *ctv.*, 2002) được xem là một trong các đặc tính quan trọng có liên

quan trực tiếp đến tiềm năng ứng dụng sinh học của chúng trong việc tạo ra các chế phẩm bảo quản thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên (Aider, 2010). Hoạt tính kháng khuẩn của chitosan phụ thuộc vào độ acetyl hóa (Jeon và *ctv.*, 2001), pH (Holappa và *ctv.*, 2006), nhiệt độ (Tsai và Su, 1999), nồng độ (Wang và *ctv.*, 2004) và dung dịch hòa tan (Qin và *ctv.*, 2006).

Gần đây, hướng nghiên cứu sử dụng nanochitosan thay thế chitosan được quan tâm nhằm tăng cường và mở rộng hơn nữa tiềm năng ứng dụng của hợp chất này cho các mục đích công nghệ sinh học và hóa học. Nanochitosan là các hạt chitosan có kích thước nanomet. Do có kích thước siêu nhỏ nên nanochitosan dễ dàng đi qua màng tế bào, diện tích và điện tích bề mặt cực lớn nên được ứng dụng nhiều trong sinh y học mang thuốc,

vaccine, trong công nghệ sinh học làm vector chuyển gen (Agnihotri và *ctv.*, 2004; Patel và *ctv.*, 2009; Zhang và *ctv.*, 2010; Trapani và *ctv.*, 2009), trong việc xử lý kim loại nặng và chất ô nhiễm hữu cơ trong nước sinh hoạt (Tamura và *ctv.*, 2010; Ge và Huang, 2010).

Ở nước ta, các nghiên cứu về nanochitosan tương đối ít mặc dù vài công trình nổi bật đã được công bố. Việc tiến hành phun chất kích thích sinh trưởng nanochitosan (kích thước 150 nm) cho lúa đã hạn chế sâu bệnh nên không cần sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (Đỗ Trường Thiện và *ctv.*, 2010). Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Anh Dzũng và *ctv.* (2011) đã sử dụng nanochitosan (kích thước 80 nm) làm tá chất kích thích miễn dịch cho vaccin cúm A/H1N1. Hoạt tính kháng nấm của phức hệ nanochitosan-tinh dầu nghệ (kích thước trên 100 nm) đã được thử nghiệm thành công trên *C. albicans*, *T. mentagrophyte*, *F. oxysporum* và *P. italicum* (Nguyễn Thị Kim Cúc và *ctv.*, 2014).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp và phân tích các đặc tính hóa lý của nanochitosan có kích thước siêu nhỏ. Ngoài ra, khả năng kháng khuẩn của nó đối với vi khuẩn gây bệnh *Salmonella typhi* cũng đã được thử nghiệm.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu, hóa chất, thiết bị

Vật liệu

Chitosan (độ deacetyl hóa > 90 %, khối lượng phân tử trung bình 450 KDa) được mua tại Công ty TNHH LONG SINH (Khu công nghiệp Suối Dầu – Cam Lâm – Khánh Hòa). Nguồn vi khuẩn VTCC-B-0480 *Salmonella typhi* được mua từ Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam trực thuộc Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hóa chất

Peptone, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CH₃COOH, Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar, BaCl₂, H₂SO₄, Sodium tripolyphosphate (TPP) (Na₅P₃O₁₀) được mua từ nhà sản xuất Wako của Nhật Bản.

Thiết bị

Máy nuôi cấy vi sinh vật Taitec Personal 11; quang phổ tử ngoại khả kiến Model: U2900 (UV-VIS Spectrophotometer)-Hitachi; máy khuấy từ IKA®RET control-visc; máy ly tâm lạnh tốc độ cao Hermle Z36HK; máy ly tâm Appendox; máy

SEM Jeol JSM-6480 LV (Viện Công nghệ Hóa học- Thành phố Hồ Chí Minh); máy nhiễu xạ tia X BRUKER XRD-D8 ADVANCE (Viện Khoa học Vật liệu- Thành phố Hồ Chí Minh); máy đo phổ FT-IR BRUKER EQUINOX 55 (Viện Công nghệ Hóa học- Thành phố Hồ Chí Minh); máy đông khô Labconco FreeZone (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang).

2.2 Phương pháp tổng hợp nanochitosan

Phương pháp tạo gel ion đã được lựa chọn để tổng hợp nanochitosan (Agnihotri và *ctv.*, 2004; Sivakami và *ctv.*, 2013). Đây là phương pháp đơn giản, rẻ tiền, giai đoạn chuẩn bị đơn giản và thực hiện trong môi trường nước, hiệu quả cao và không độc hại. Hòa tan 20 mg chitosan được trong 40 ml dung dịch 2,0 % (v/v) acid acetic. Sau đó, nhỏ giọt từ từ 20 ml dung dịch nồng độ 0,75 mg sodium tripolyphosphate/ml vào 40 ml dung dịch trước đó. Hạt nanochitosan khi hình thành sẽ xuất hiện dưới dạng lơ lửng trong dung dịch và dung dịch được ly tâm với vận tốc 17000 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi ly tâm, bỏ lớp dung dịch bên trên, thu lấy lớp rắn bên dưới và rửa nhiều lần với nước cất. Hạt nanochitosan được đông khô chân không để sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

2.3 Phương pháp phân tích các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan tổng hợp

Kích thước và hình dáng hạt nanochitosan được xác định bằng cách chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Kính hiển vi này là công cụ rất mạnh trong việc nghiên cứu cấu trúc ở cấp độ nano. Nó cho phép quan sát chính xác cấu trúc và kích thước của hạt nano.

Quang phổ hồng ngoại của hạt nanochitosan: Dựa vào phổ của chitosan ban đầu, ta có thể được quan sát sự khác biệt của các đỉnh hấp thụ trong sản phẩm nanochitosan.

Phổ nhiễu xạ tia X: Mức độ tinh thể của hạt nanochitosan tổng hợp được đánh giá thông qua phổ nhiễu xạ tia X.

2.4 Thử nghiệm đặc tính kháng khuẩn của hạt nanochitosan tổng hợp

2.4.1 Nuôi tăng sinh vi khuẩn

Môi trường nuôi tăng sinh vi khuẩn *Salmonella typhi*: Dung dịch peptone đậm (Sadovskii, 1977).

Thí nghiệm nuôi tăng sinh vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi cấy sinh khối trong ống nghiệm chứa môi trường peptone đậm ở điều kiện 37 °C, với tốc độ lắc 120 vòng/phút trong 24 h.

Xác định mật độ vi khuẩn: Dịch vi khuẩn sau khi nuôi cấy được đo độ đục bằng UV spectrophotometer ở bước sóng 625 nm, với giá trị OD trong khoảng 0,08-0,1. Mật độ vi khuẩn trong dung dịch nuôi được tính toán dựa vào độ đục chuẩn 0,5 McFarland (McFarland và *ctv*, 1907) tương ứng với mật độ $1,5 \times 10^8$ vi khuẩn/ml. Huyền phù dịch vi khuẩn sau khi pha loãng có số lượng vi khuẩn 10^8 vi khuẩn/ml được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

2.4.2 Thí nghiệm khả năng ức chế vi khuẩn *Salmonella typhi* của chitosan và nanochitosan (Andrews, 2001)

Trong thí nghiệm này, mỗi ống nghiệm chứa 5,0 mL môi trường dung dịch peptone đậm được hấp khử trùng trong 15 phút ở 121°C , sau đó được để nguội về nhiệt độ phòng.

Dãy thí nghiệm 1: 5 mg chitosan hoặc 5 mg nanochitosan được hòa tan trong 5 ml dung dịch acid acetic 0,25 % sao cho nồng độ của dung dịch chứa chitosan hay nanochitosan là 1 mg/ml. Chitosan được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch, trong khi đó nanochitosan không tan và được lắc đều để các hạt phân tán tốt trong dung dịch trước khi cho vào môi trường. Dung dịch đối chứng là dung dịch acid acetic 0,25 %. Giá trị pH của môi trường có chứa dịch đối chứng là 4,90. Lô thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

Dãy thí nghiệm 2: 5 mg chitosan hoặc 5 mg nanochitosan được hòa tan trong 5 ml dung dịch acid acetic 0,0625 % sao cho nồng độ của dung dịch chứa chitosan hay nanochitosan là 1 mg/ml. Dung dịch đối chứng là dung dịch acid acetic 0,0625 %. Giá trị pH của môi trường đối chứng là 5,35. Lô thí nghiệm tương tự cũng được lặp lại 2 lần.

Quá trình được tiến hành như sau: Hút 5 ml mỗi dung dịch chitosan/nanochitosan (nồng độ 1 mg/ml) vào ống nghiệm chứa môi trường nuôi đã được chuẩn bị sẵn, lắc đều và tiếp tục hút 5 ml dung dịch ống trước đó vào ống nghiệm tiếp theo. Nồng độ cuối cùng của dung dịch chitosan/nanochitosan lần lượt là 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml. Ngoài ra, các ống nghiệm chứa môi trường có dung dịch acid acetic được sử dụng làm đối chứng. Sau đó, dùng micropipet hút 50 μL của dung dịch huyền phù vi khuẩn có số lượng 10^8 vi khuẩn/ml cho vào từng ống nghiệm chứa các nồng độ đã chuẩn bị như trên. Các ống nghiệm được lắc

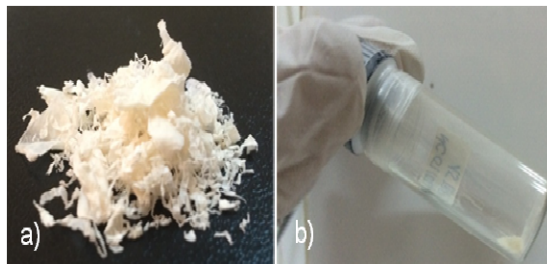
đều và nuôi trong bồn ủ nhiệt với nhiệt độ 37°C , tốc độ lắc 120 vòng/phút trong 24 giờ. Sau 24 h, dung dịch vi khuẩn ở các ống nghiệm được cấy trên đĩa thạch sử dụng môi trường nuôi cấy đặc hiệu cho vi khuẩn *Salmonella typhi* là Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (Nye và *ctv*, 2002). Các đĩa thạch sau đó được ủ ở 37°C và sự phát triển của vi khuẩn được quan sát sau 24 h để xác định khả năng kháng khuẩn của các chất nghiên cứu.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan tổng hợp

3.1.1 Hình dạng ngoài của nanochitosan

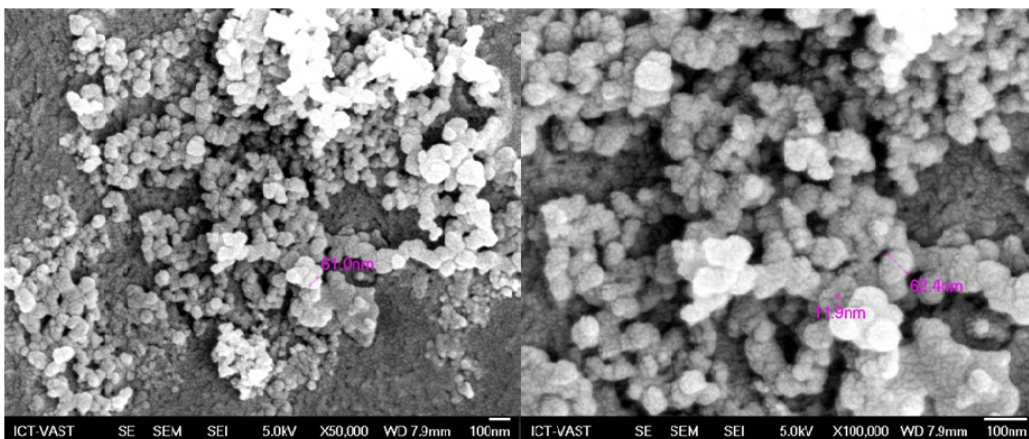
Hình 1 cho thấy hình dạng của nguyên liệu chitosan ban đầu (Hình 1a) và hạt nanochitosan tổng hợp (Hình 1b). Nguyên liệu chitosan ban đầu có dạng vảy, màu trắng; hạt nanochitosan sau tổng hợp có dạng bột mịn, màu trắng sáng.



Hình 1: Hình dạng ngoài của chitosan (a) và nanochitosan tổng hợp (b)

3.1.2 Hình ảnh của hạt nanochitosan tổng hợp được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét

Các hạt nanochitosan hình thành có dạng hình cầu và kích thước đồng đều, các hạt tròn có kích thước tương đối nhỏ 12 nm, tập hợp lại thành các khối kích thước lớn hơn khoảng 61-62 nm (Hình 2). Hạt nanochitosan của chúng tôi tổng hợp được có kích thước nhỏ hơn rất nhiều so với các các nghiên cứu trước đây sử dụng cùng phương pháp (54- 150 nm). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tỉ lệ theo khối lượng của TPP : chitosan là 3: 2 để tổng hợp sản phẩm nanochitosan. So sánh với các nghiên cứu trước, Du và *ctv*. (2004) sử dụng tỉ lệ TPP : chitosan 1: 7,5 ; Đỗ Trường Thiện và *ctv* (2010) TPP : chitosan 1: 4 ; Nguyễn Anh DZùng và *ctv* (2011) TPP : chitosan 1: 6 ; Nguyễn Thị Kim Cúc và *ctv*. (2014) TPP : chitosan 1: 5 để tạo ra các hạt có kích thước tương ứng là 54 nm, 150 nm ; 80 nm và 100 nm.



Hình 2: Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của hạt nanochitosan

3.1.3 Phổ hồng ngoại của các hạt nanochitosan

Quan sát bước đầu phổ hồng ngoại cho thấy có sự khác biệt giữa các đỉnh hấp thụ của chitosan và nanochitosan. Phổ trong Hình 3 và bảng số liệu 1 cho thấy các đỉnh hấp thụ đặc trưng điển hình của nanochitosan trong nghiên cứu này giống như các nghiên cứu trước đây (Qì và *ctv.*, 2004; Sivakamia và *ctv.*, 2013).

Bảng 1: So sánh phổ hồng ngoại của chitosan và nanochitosan

Đỉnh hấp thụ	Chitosan (cm ⁻¹)	Nanochitosan (cm ⁻¹)
-OH liên hợp	3445	3458
-CH	2909	2935
-NH ₂	1630	1500
-P=O		1257
-C=O	1680	1654

Trên phổ hồng ngoại của chitosan (màu đen) có đỉnh hấp thụ nằm ở 3445 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm -OH liên hợp, trong khi đó phổ hồng ngoại nanochitosan (màu đỏ) có đỉnh hấp thụ ở 3458 cm⁻¹.

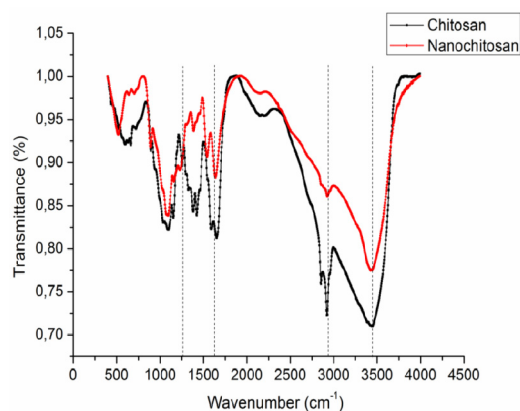
– Đỉnh hấp thụ ở 2909 cm⁻¹ của chitosan đặc trưng cho dao động hoá trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm -CH, đỉnh này tương ứng với giá trị 2935 cm⁻¹ của nanochitosan.

– Đỉnh hấp thụ ở 1680 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của -C=O của chitosan, dấu hiệu của chitosan 90% deacetyl hóa, đỉnh hấp thụ này ở

1654 cm⁻¹ đối với nanochitosan.

– Đỉnh hấp thụ ở 1630 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của NH₂ của chitosan, đỉnh này của nanochitosan xuất hiện ở 1500 cm⁻¹, điều này chứng tỏ NH₂ đã liên kết với tripolyphosphate trong nanochitosan.

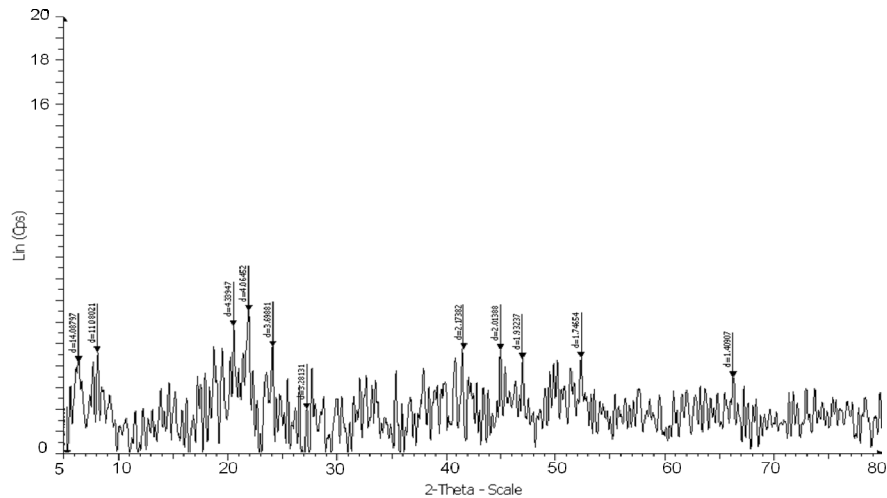
– Đỉnh hấp thụ ở 1257 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm -P=O, dao động này chỉ xuất hiện ở nanochitosan.



Hình 3: Phổ hồng ngoại của chitosan ban đầu và nanochitosan sau tổng hợp

3.1.4 Phổ nhiễu xạ tia X của hạt nanochitosan

Mức độ tinh thể của hạt nanochitosan được đánh giá thông qua phổ nhiễu xạ tia X. Giản đồ nhiễu xạ tia X được đo trong khoảng 2θ từ 5 đến 80°.



Hình 4: Giảm độ nhiễu xạ tia X của nanochitosan

Theo công bố trong các tài liệu trước, giảm độ nhiễu xạ tia X của chitosan có hai mũi nhọn ở 2θ là $10,5^\circ$ và 20° (Zhang và *ctv.*, 2005; Kumirska và *ctv.*, 2010). Tuy nhiên, theo hình 4, không có đỉnh nào tương ứng được tìm thấy trong giảm độ nhiễu xạ tia X của nanochitosan sau khi tổng hợp. Điều này cho thấy cấu trúc tinh thể của chitosan đã hoàn toàn bị phá hủy sau khi hình thành nối ngang với TPP để tạo thành nanochitosan (Qì và *ctv.*, 2004).

3.2 Đặc tính kháng khuẩn của hạt nanochitosan tổng hợp

Kết quả kháng khuẩn của chitosan và nanochitosan tổng hợp trong dãy thí nghiệm 1 được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Salmonella typhi* của chitosan và nanochitosan trong dung dịch acid acetic 0,25 %

Dung dịch	Độ pha loãng		
	x2	x4	x8
Chitosan (1 mg/ml)	+	+	+
Nanochitosan (1 mg/ml)	+	-	-
Acid acetic 0,25 %	+	-	-

Ghi chú : + : ức chế, - : không ức chế

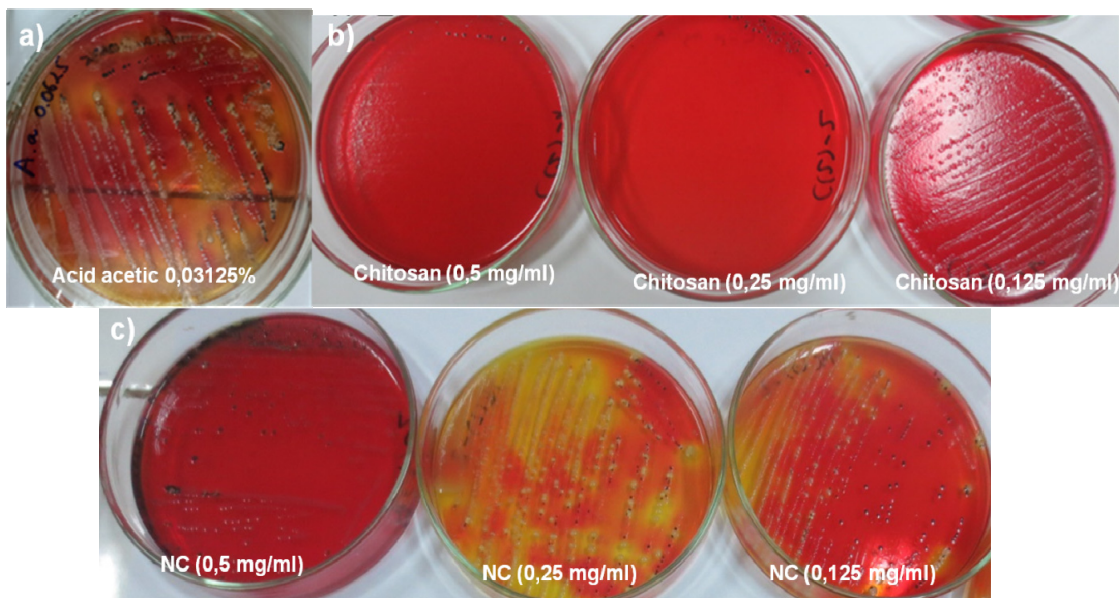
Với thí nghiệm này, dung dịch đối chứng acid acetic có nồng độ là 0,125 % đã gây chết vi khuẩn. Kết quả này có khác với kết quả của Qì và *ctv.* (2004), cho thấy nồng độ acid acetic 0,25 % an toàn cho sự phát triển của vi khuẩn. Trong các thí nghiệm trên, không thể kết luận khả năng kháng khuẩn của nanochitosan vì nanochitosan ở nồng độ 0,5 mg/ml và dung dịch acid acetic đối chứng ở nồng độ 0,125 % đều giết chết vi khuẩn thử nghiệm. Do đó, chúng tôi đã dùng nồng độ acid acetic là 0,0625 % trong thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả dãy thí nghiệm 2 được trình bày trong Bảng 3 và Hình 5.

Bảng 3: Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Salmonella typhi* của chitosan và nanochitosan trong dung dịch acid acetic 0,0625 %

Dung dịch	Độ pha loãng		
	x2	x4	x8
Chitosan (1 mg/ml)	+	+	-
Nanochitosan (1 mg/ml)	-	-	-
Acid acetic 0,0625 %	-	-	-

Ghi chú : + : ức chế, - : không ức chế



Hình 5: Sự phát triển của vi khuẩn trên đĩa thạch XLD: a) đối chứng acid acetic nồng độ 0,03125 %; b) nồng độ 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml của chitosan; c) nồng độ 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml của nanochitosan

Như mô tả trong Bảng 3 và Hình 5, để theo dõi sự phát triển của vi khuẩn, 10 μ L dung dịch ống đối chứng với nồng độ acid acetic 0,03125 % được cấy lên đĩa thạch. Kết quả cho thấy nồng độ acid acetic 0,03125% là an toàn cho vi khuẩn. Vi khuẩn phát triển tốt sau 24 h ủ ở 37°C (Hình 5a).

Trong loạt thí nghiệm của chitosan, Hình 5b cho thấy khả năng kháng vi khuẩn của dung dịch chitosan ở nồng độ 0,5; 0,25 mg/ml. Dung dịch chitosan mất tính kháng khuẩn khi giảm nồng độ còn 0,125 mg/ml; ở đĩa thí nghiệm cuối (Hình 5b), cho thấy vi khuẩn vẫn phát triển tốt. Nồng độ ức chế vi khuẩn *Salmonella typhi* của chitosan trong nghiên cứu này (0,5 mg/ml) tương tự với nghiên cứu của Du và *ctv.* (2009) (0,468 mg/ml) trên các loài *E. coli*, *S. choleraesuis* và *S. aureus*.

Loạt thí nghiệm ức chế sự phát triển vi khuẩn của nanochitosan cho thấy dung dịch nanochitosan từ nồng độ cao nhất 0,5 mg/ml đến 0,25 và thấp nhất 0,125 mg/ml không thể hiện tính kháng khuẩn (Hình 5c). Qua kết quả các thí nghiệm có thể thấy nanochitosan có kích thước siêu nhỏ được tổng hợp không thể hiện tính kháng khuẩn trên loài nghiên cứu.

Các nghiên cứu trước đây về hoạt tính kháng khuẩn của nanochitosan tổng hợp bằng phương pháp gel ion, kích thước hạt trung bình đều lớn hơn 40 nm (Qì và *ctv.*, 2004; Du và *ctv.*, 2009; Đỗ Trường Thiện và *ctv.*, 2010). Qua so sánh hoạt tính kháng khuẩn của các hạt nanochitosan ở kích thước

khác nhau: 196 nm; 394 nm; 598 nm; 872 nm, Sarwar và *ctv.* (2014) cho biết hạt có kích thước nhỏ nhất 196 nm có khả năng kháng khuẩn tốt nhất. Việc giảm tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn được quan sát thấy trong tất cả các thử nghiệm của các hạt kích thước khác nhau, nhưng hạt ở kích thước 196 nm và 394 nm gây ra tỷ lệ chết của *E. coli* và *S. aureus* cao hơn. Trong những giờ đầu tiên, tất cả các hạt ức chế vi khuẩn phát triển nhanh hơn, sau đó tỷ lệ ức chế dần giảm.

Về khả năng mất hoạt tính kháng khuẩn của nanochitosan, chúng tôi cho rằng nó có liên quan đến tính ổn định của nanochitosan trong dung dịch. Theo báo cáo của Chattopadhyay và *ctv.* (2012), sự phân hủy sinh học của dung dịch nanochitosan phụ thuộc vào kích thước của hạt nanochitosan. Kích thước hạt càng lớn, độ nhớt dung dịch càng cao và ngược lại. Dung dịch nanochitosan càng bền khi kích thước hạt càng lớn và sự phân hủy sinh học hoàn toàn của dung dịch nanochitosan là khoảng 3-4 ngày. Chattopadhyay đề nghị chỉ sử dụng dung dịch nanochitosan trong vòng 24 h cho các ứng dụng hóa lý tiếp theo. Trong một nghiên cứu khác về hoạt tính kháng khuẩn của vật liệu nanochitosan của Mirhashemi và *ctv.* (2013), nhóm nghiên cứu đã kết hợp nanochitosan hay nanochitosan-ZnO với Transbond XT, một loại composite kết dính có khả năng polymer hóa, tạo thành một hợp chất nanochitosan bền vững hơn trong điều kiện thử nghiệm hoạt tính của nanochitosan. Sự kết hợp nanochitosan với các kim loại như Ag (Pinto và

ctv., 2011); Cu (Qì và ctv., 2004); Zn, Mg và Fe (Du và ctv., 2009) làm tăng độ bền của nanochitosan và do đó có khả năng kháng khuẩn tốt hơn so với nanochitosan riêng lẻ.

Trong trường hợp thí nghiệm của chúng tôi, kích thước hạt tương đối nhỏ (12 nm) có thể ảnh hưởng đến độ bền dung dịch nanochitosan. Dung dịch nanochitosan mặc dù được sử dụng trong vòng 24 h tính từ khi tổng hợp nanochitosan có thể đã bị biến tính. Các hạt nanochitosan nhanh chóng bị kết tủa dưới đáy ống nghiệm trong quá trình thử hoạt tính kháng khuẩn, chưa kịp phát huy hoạt tính để ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Do đó, các hạt nanochitosan riêng lẻ ở kích thước nhỏ có thể không thích hợp sử dụng kháng khuẩn, cần kết hợp chúng với các hợp chất khác để tạo các phức hợp bền hơn. Mặt khác, các nghiên cứu về ứng dụng khác của nanochitosan kích thước siêu nhỏ cần được quan tâm.

4 KẾT LUẬN

Nanochitosan có kích thước nhỏ 12 nm đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tạo gel ion và các đặc tính hóa lý nó cũng đã được mô tả. Nanochitosan kích thước nhỏ không có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Salmonella typhi*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M. 2004. Recent Advances on Chitosan-based Micro and Nanoparticles in Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* 100: 5-28.
2. Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology* 43(6): 837-842.
3. Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (1): 5-16.
4. Bae, K., Jun, E. J., Lee, S. M., Paik, D. I., Kim, J. B. 2006. Effect of water soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clinical Oral Investigations* 10: 102-107.
5. Chattopadhyay, D.P., Inamdar, M.S. 2012. Studies on Synthesis, Characterization and Viscosity Behaviour of Nano Chitosan. *Research Journal of Engineering Sciences* 1(4): 9-15
6. Du, W. L., Niu, S. S., Xu, Y. L., Xu, Z. R., Fan, C. L. 2009. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers* 75: 385-389.
7. Đỗ Trường Thiện. 2010. Báo cáo kết quả nghiên cứu Đề tài KC02.09/06-10: Nghiên cứu chế tạo vật liệu nanochitosan ứng dụng trong dược phẩm và trong nông nghiệp.
8. Ge, H., Huang, S. 2010. Microwave Preparation and Adsorption Properties of EDTA-Modified Cross-Linked Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 115: 514-519.
9. Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71: 235-244.
10. Holappa, J., Martha, H., Mar, M., Ogmundur, R., Tomas, A., Pasi, S. 2006. Antimicrobial activity of chitosan N-betainates, *Carbohydrate Polymers* 65: 114-118.
11. Jeon, Y. J., Park, P. J., Kim, S. K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers* 44:71-76.
12. Jing, S. B., Li, L., Ji, D., Takiguchi, Y., Yamaguchi, T. 1997. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49(7): 721 - 723.
13. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. 2010. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs* 8: 1567-1636.
14. McFarland, J., Jama, M.D., 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *XLIX (14):1176-1178*.
15. Mirhashemi, A. H. , Bahador, A., Kasae, M. Z., Daryakenari, G. H., Ahmad Akhondi, M. S., Sodagar, A. 2013. Antimicrobial Effect of Nano-Zinc Oxide and Nano-Chitosan Particles in Dental Composite Used in Orthodontics. *Journal of Medical Bacteriology*. 2 (3, 4): 1-10.

16. Nguyễn Anh Dzũng, Nguyễn Thị Ngọc Hà, Đặng Thị Hồng Vân, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Đinh Minh Hiệp, Lê Văn Hiệp. 2011. Chitosan Nanoparticle as a Novel Delivery System for A/H1N1 Influenza Vaccine: Safe Property and Immunogenicity in Mice. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 5: 1228-1235.
17. Nguyễn Thị Kim Cúc, Trần Thị Kim Dung, Phạm Việt Cường. 2014. Assessment of antifungal activity of turmeric essential oil-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 4(3): 2347-2356.
18. No, K. H., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74: 65–72.
19. Nye, K.J., Fallon, D., Frodsham, D. 2002. An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB, and ABC agars as direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from faeces. *Journal of Clinical Pathology* 55 (4): 286–8.
20. Patel, J. K., Jivani, N. P. 2009. Chitosan Based Nanoparticles in Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2(2): 517-522.
21. Pinto, R. J., Fernandes, S.C., Freire, C. S. 2011. Antibacterial activity of optical transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydrate Research* 348: 7-83.
22. Qi, Li., Xu, Zirong., Jiang, X., Hu, C., Zou, X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339: 2693–2700.
23. Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y. 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 63: 367-374.
24. Richardson, Simon.C.W., Kolbe Hanno, V.J., Duncan, R. 1999. Chitosan copolymers for intranasal Delivery of Insulin. *C.A, Vol 130, N025, 1141(342,853u)*, England.
25. Sadovski, A. Y. 1977. Technical note: Acid sensitivity of freeze injured salmonellae in relation to their isolation from frozen vegetables by pre-enrichment procedure. *International Journal of Food Science and Technology* 12:85-91.
26. Sarwar, A., Katas, H., Zin, N. M. 2014. Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *Journal of Nanoparticle Research* 16: 2517.
27. Sivakamia, M.S., Thandapani, G., Jayachandran, V., Hee-Seok, J., Se-Kwon, K., Sudhaa, P.N. 2013. Preparation and characterization of nanochitosan for treatment wastewaters. *International Journal of Biological Macromolecules* 57: 204– 212.
28. Tamura, A., Satoh, E., Kashiwada, A., Matsuda, K., Yamada, K. 2010. Removal of Alkylphenols by the Combined Use of Tyrosinase Immobilized on Ion Exchange Resins and Chitosan Beads. *Journal of Applied Polymer Science* 115: 137–145.
29. Trapani, A., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Kissel, T. 2009. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 375: 97–106.
30. Tsai, G.J., Su, W.H. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 62: 239–243.
31. Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Lalitha, R. G., Tharanathan, R. N. 2004. Low molecular weight of chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1670(2):137–146.
32. Wang, X., Du, Y., Liu, H. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex, *Carbohydrate Polymers* 56: 21–26.
33. Zhang, H-L., Wu, S-H., Tao, Y, Zang, L-Q., Su, Z-Q. 2010. Preparation and Characterization of Water Soluble Chitosan Nanoparticles as Protein Delivery System. *Journal of Nanomaterials* 2010: 1-5.
34. Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., Zhang, X. 2005. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* 340: 1914–1917.