

# TỔNG HỢP VÀ ĐẶC TÍNH HÓA HIỆU QUẢ KHÁNG NẤM CỦA NANOCHITOSAN

## NANOCHITOSAN: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL STUDY

Nguyễn Thị Hiếu Trang, Lê Sĩ Ngọc, Nguyễn Hoàng Thảo Ly,  
Phạm Thị Hà Vân, Phạm Quang Thắng

Trung Tâm Nghiên Cứu và Phát Triển Nông Nghiệp Công Nghệ Cao, Việt Nam

Ngày toà soạn nhận bài 22/9/2016, ngày phân biện đánh giá 08/10/2016, ngày chấp nhận đăng 18/01/2018.

### TÓM TẮT

Hạt nanochitosan được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel ion với tripolyphosphate (TPP) và chất bảo vệ là polyvinyl pyrrolidone K-30 (PVP), và các đặc tính được đánh giá thông qua kích thước hạt. Các hạt nanochitosan hình thành có kích thước dao động trong khoảng từ 40 – 300 nm ở điều kiện pH 4,5 và tỷ lệ khối lượng CTS/ TPP là 6:1. Các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan được đánh giá thông qua nhiễu xạ tia X (XRD), ảnh kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE – SEM), ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và tán xạ laser động học (DLS). Sau 72 giờ, nồng độ nanochitosan 150 ppm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Phanerochaete salminicolor*, *Cercospora sp.* và *Corticium salmonicola Berk.* trong điều kiện *in vitro* tương ứng 76,86%; 97,85% và 97,08 %. Chế phẩm nanochitosan được chế tạo bằng phương pháp tạo gel ion hứa hẹn sẽ là một sản phẩm công nghệ cao, an toàn và hiệu quả kháng nấm cao.

**Từ khóa:** Nanochitosan; TPP; *Cercospora sp.*; *Corticium salmonicola Berk.*; *Phanerochaete salminicolor*; *Dendrobium sonia*.

### ABSTRACT

Nanochitosan particles are synthesized by ionic gelation method using tripolyphosphate (TPP) and protective polyvinyl pyrrolidone K-30 (PVP), and then characterized by particle size determination. The prepared nanoparticles have an average diameters ranging from 40 – 300 nm in solution pH 4.5 and CTS/ TPP weight ratio (6:1). Their physicochemical properties were tested by X-Ray Diffraction (XRD), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE – SEM), Transmission Electronic Microscope (TEM) and dynamic Light Scattering (DLS). After 72 hours, the nanochitosan concentration of 150 ppm inhibited the growth of *Phanerochaete salminicolor*, *Cercospora sp.* và *Corticium salmonicola Berk.* in *in vitro* was 76.86%, 97.85 and 97.08%, respectively. Nanochitosan product is prepared by ionic gelation method may be potentially used as a high-tech, safe and high antifungal efficiency.

**Keywords:** Nanochitosan; TPP; *Cercospora sp.*; *Corticium salmonicola Berk.*; *Phanerochaete salminicolor*.

## 1. GIỚI THIỆU

Chitosan và oligochitosan là những polyme có nguồn gốc thiên nhiên được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống. Chúng được dùng làm chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất kháng khối u, chất gây hiệu ứng tăng cường miễn dịch,

chất kích kháng bệnh và thúc đẩy tăng trưởng cho cây trồng, chất mang trong dược phẩm. Hiện nay trên thế giới có khuynh hướng tìm kiếm các chất có nguồn gốc tự nhiên có hoạt tính chống oxy hóa như peptide, carbohydrate..., đặc biệt chitosan, chitooligosaccharides (COS) và các dẫn xuất

của chúng hiện đang thu hút nhiều nhà khoa học nghiên cứu trên thế giới với hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm.

Chitosan được sử dụng làm nguyên liệu điều chế hạt nanochitosan vì những tính chất ưu việt của nó ở kích thước nano. Với nhiều tính năng như tính tương thích sinh học, phân hủy sinh học, bám dính màng và không độc hại, nó trở thành nguyên liệu cho nhiều ứng dụng dược sinh học. Chitosan có khả năng kìm hãm sự phát triển *in vitro* của một số lượng lớn các loại nấm bệnh. Nhóm tác giả Nguyen và cộng sự năm 2014, đã thử nghiệm thành công hoạt tính kháng nấm của phức hợp nanochitosan – tinh dầu nghệ (kích thước 100 nm) trên *C.albicans*, *T. mentagrophyte*, *F. oxysporum* và *P.italicum* [1]. Ngoài việc tạo nên những lớp màng thấm khí, chitosan còn có một chức năng kép. Chúng vừa trực tiếp tấn công đến quá trình phát triển của nấm, vừa hoạt hóa một số quá trình đáp ứng miễn dịch, tăng khả năng đề kháng. Hiện nay, hướng nghiên cứu sử dụng nano để phòng trừ sâu bệnh hại đang và đã phát triển sâu và rộng ở nhiều lĩnh vực khác nhau. Nanochitosan vừa có đặc tính kháng nấm khuẩn, kháng oxi hoá của chitosan vừa kế thừa những đặc tính nổi bật của công nghệ nano. Do đó, ứng dụng nanochitosan trong phòng trừ nấm bệnh là hướng nghiên cứu đúng và phù hợp với một nước nông nghiệp như Việt Nam.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp tạo gel ion

Cơ chế của phương pháp này dựa trên tương tác tĩnh điện giữa chitosan tích điện dương và một polyanion như tripolyphosphate [2, 3]. Kỹ thuật này có ưu điểm là giai đoạn chuẩn bị đơn giản và thực hiện trong môi trường nước. Đầu tiên 0,25g chitosan được hòa tan vào 50 ml dung dịch axit acetic 1% (v/v). Sau đó nhỏ giọt 27,78 ml tripolyphosphate (0,15%) vào 50 ml dung dịch chitosan để tạo hạt nanochitosan dưới điều kiện khuấy từ liên tục 300 vòng/ phút tại nhiệt độ phòng. Dung dịch chứa hạt nanochitosan được ly tâm 10.000 vòng/ phút, ở nhiệt độ phòng trong 15 phút bằng máy Zentrifugen Z36HK. Thu hạt nanochitosan

và rửa lại với nước cất 3 lần. Hạt nanochitosan được sấy khô ở 55°C trong 24 giờ và hạt nanochitosan được phân tán trong 20 ml dung dịch PVP 2%.

### 2.2 Phương pháp phân tích mẫu

#### 2.2.1 Phân tích mẫu

Dung dịch nanochitosan được phân tích chỉ tiêu phân bố kích thước hạt (DLS) (máy Horiba – LB550 (Japan), tại Phòng Thí Nghiệm Công Nghệ Nano – Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh); ảnh kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM)(máy S-4800-Hitachi Japan tại Trung Tâm Nghiên Cứu Triển Khai, Khu Công Nghệ Cao Thành Phố Hồ Chí Minh); Ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (máy JEM – 1400 tại Phòng Thí Nghiệm Trọng Điểm Quốc Gia Polymer & Composite, Đại Học Bách Khoa, Thành Phố Hồ Chí Minh); nhiễu xạ tia X (máy D8 Advance, Bruker – Germany tại Phòng Phân Tích Hóa Lý, Viện Khoa Học Vật Liệu Ứng Dụng, Thành Phố Hồ Chí Minh).

#### 2.2.2 Khảo sát khả năng kháng nấm *in vitro*

Dùng micropipette hút 100µl dung dịch nanochitosan được phối vào 20ml môi trường PDA theo các nồng độ 50, 100, 150ppm và được đổ trên đĩa petri [4]. Chúng nấm kiểm định (*Cercospora* sp., *Phanerochaete salminicolor*, *Corticium salmonicola Berk.*) sẽ được cấy chấm điểm ở trung tâm trên đĩa môi trường bằng que cấy móc, đối với đĩa đối chứng chỉ cấy chấm điểm nấm trên môi trường PDA và ủ đĩa thạch ở 25°C ± 2°C. Sau 72 giờ, quan sát đường kính vòng phát triển của tơ nấm.

#### 2.2.3 Phương pháp xác định hiệu quả kháng nấm (1) [5]

$$H = \frac{D_{đc} - D_{tn}}{D_{đc}} \times 100 (\%) \quad (1)$$

Trong đó:

H: hiệu quả kháng nấm

$D_{đc}$  : Đường kính khuẩn lạc nấm trên đĩa đối chứng

$D_{tn}$  : Đường kính khuẩn lạc nấm trên đĩa thử nghiệm

### 2.2.4 Phương pháp xử lý thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Stagraphic 7.0 ở mức ý nghĩa 95%.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

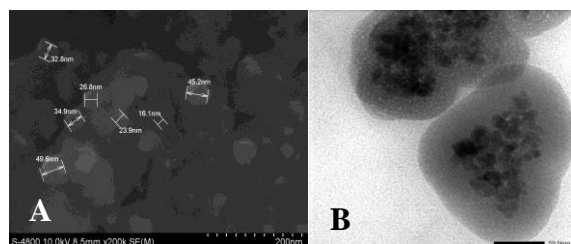
### 3.1 Các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan được tổng hợp

Dung dịch nanochitosan sau phản ứng được ly tâm thu toàn bộ hạt nano với tốc độ 10000 vòng/ phút trong 15 phút, giữ lại phần kết tủa và rửa với nước cất nhiều lần đạt pH 6,5 – 7 để loại bỏ acid acetic. Phần kết tủa được sấy khô để xác định hiệu suất thu hồi ở nhiệt độ 55°C sau 24 giờ (Hình 1). Theo kết quả thống kê thu được khối lượng trung bình của nanochitosan là  $0,20^a \pm 0,01g$  và hiệu suất thu hồi hạt nanochitosan sau phản ứng đạt 78%.



Hình 1. Bột nanochitosan sau phản ứng được sấy ở 55°C trong 24h

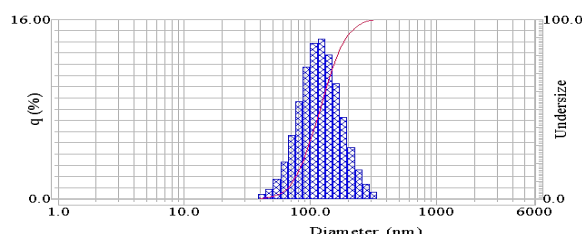
Kết quả ảnh FE – SEM (Hình 2A) cho thấy kích thước hạt nanochitosan là dưới 50 nm, đồng đều và phân bố khá tập trung. Kích thước hạt nanochitosan một lần nữa được đánh giá thông qua kết quả phân tích TEM ở Hình 2B, cho thấy một số hạt có kích thước trên 50 nm. Kết quả này chưa thật sự trùng khớp với kết quả khảo sát ảnh FE – SEM. Tuy nhiên, theo kết quả phân bố kích thước hạt nanochitosan được phân tích bằng phương pháp DLS (Hình 3) cho thấy kích thước hạt dao động từ 40 – 300 nm.



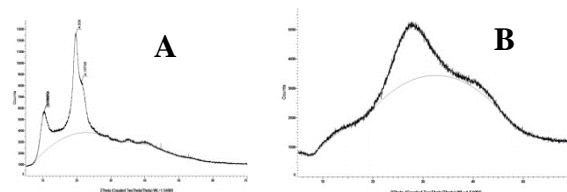
Hình 2. Ảnh FE – SEM (a) và TEM (b) của mẫu dung dịch nanochitosan

Phổ nhiễu xạ tia X của nanochitosan có một đỉnh rộng tại  $2\theta = 27^\circ$  ở Hình 4B, so sánh kết quả XRD của nanochitosan với chitosan tinh khiết thấy rằng có một sự thay đổi đáng kể trong hình ảnh nhiễu xạ. Sự xuất hiện của đỉnh rộng ở mẫu nanochitosan có thể do sự gia tăng liên kết ngang ion giữa TPP và các chuỗi chitosan làm biến dạng các vùng tinh thể để tạo thành nanochitosan. Kết quả phổ XRD của nanochitosan sau khi được tổng hợp cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Vijayalakshmi và cộng sự [6] đánh giá thông qua phổ nhiễu xạ tia X được đo trong khoảng  $2\theta$  từ 5 đến  $80^\circ C$  cho thấy kết quả phù hợp với các công trình nghiên cứu trước đây [3, 7, 8].

Kết quả khảo sát này gây sự bất ngờ bởi vì khi sử dụng nguyên liệu chitosan có phân tử lượng lớn (573kDa), theo dự tính ban đầu thì hạt nanochitosan sẽ có kích thước lớn. Thế nhưng, trong suốt quá trình khảo sát, kích thước hạt chỉ dao động trong khoảng 40 – 300 nm. Quá trình khuấy từ hỗn hợp CTS và TPP đã giúp bẻ gãy phân tử chitosan. Các phân tử chitosan càng dài sẽ càng dễ bị vướng mắc vào nhau và chịu ảnh hưởng của lực cắt này mạnh hơn, hình thành hạt nhỏ hơn.



Hình 3. Ảnh DLS của mẫu dung dịch nanochitosan



Hình 4. Phổ nhiễu xạ tia X của nguyên liệu chitosan (A) và nanochitosan (B)

### 3.2 Hiệu quả kháng nấm gây bệnh trên thực vật của nanochitosan in vitro

Hiệu quả kháng nấm gây bệnh trên thực vật của nanochitosan in vitro ở các nồng độ

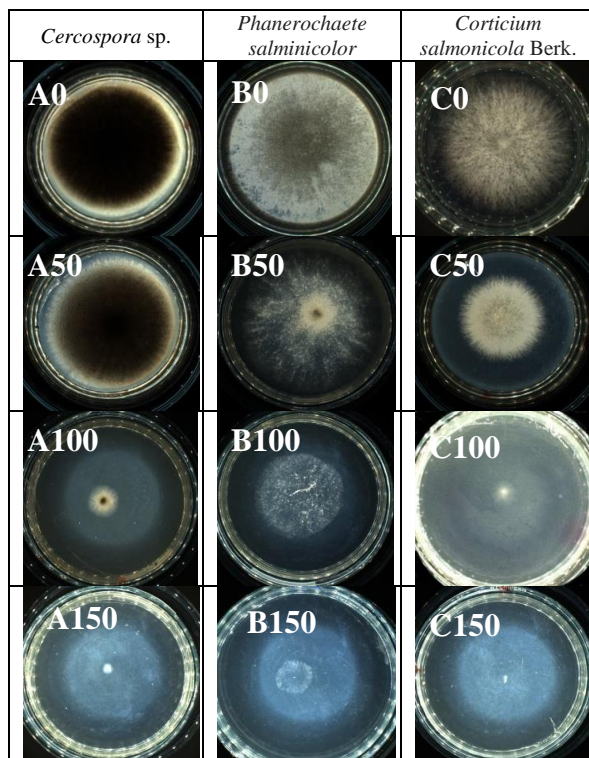
khác nhau được thể hiện rõ ở Hình 5. Khi nồng độ nanochitosan tăng, khả năng kháng nấm tăng, thể hiện ở đường kính phát triển của tơ nấm. Trong đó, tại nồng độ 50 ppm đường kính phát triển tơ nấm *Cercospora* sp. là 67,58

mm so với mẫu đối chứng, đường kính tơ nấm phát triển sau 72 giờ là 68,40 mm (Hình 5 A0). Tuy nhiên, đường kính phát triển của tơ nấm giảm đáng kể ở nồng độ 100 và 150 ppm lần lượt là 9,91 và 1,47 mm (Bảng 1).

**Bảng 1.** Hiệu quả kháng nấm gây bệnh trên thực vật của nanochitosan *in vitro*

Nồng độ (ppm)	<i>Cercospora</i> sp. (mm)	Hiệu quả kháng nấm (%)	<i>Phanerochaete salminicolor</i> (mm)	Hiệu quả kháng nấm (%)	<i>Corticium salmonicola</i> Berk. (mm)	Hiệu quả kháng nấm (%)
0	68,40 <sup>c</sup> ±1,85	-	77,53 <sup>d</sup> ±3,96	-	68,16 <sup>d</sup> ±1,38	-
50	67,58 <sup>c</sup> ±1,54	1,20	71,90 <sup>c</sup> ±2,25	7,26	43,29 <sup>c</sup> ±3,16	36,49
100	9,91 <sup>b</sup> ±1,00	85,51	45,20 <sup>b</sup> ±5,41	41,70	10,94 <sup>b</sup> ±0,72	83,95
150	1,47 <sup>a</sup> ±0,43	97,85	17,94 <sup>a</sup> ±0,52	76,86	1,99 <sup>a</sup> ±0,21	97,08
P	*					

Ghi chú: \* khác biệt có ý nghĩa (mức  $\alpha = 0,05$ ); \*\* khác biệt rất có ý nghĩa (mức  $\alpha = 0,01$ ); ns: không có ý nghĩa.



Ghi chú: “A, B, C” là chủng nấm kiểm định *Cercospora* sp., *Phanerochaete salminicolor*., *Corticium salmonicola* Berk.

“0, 50, 100, 150” là lô nghiệm thức xử lý với nồng độ nanochitosan 0, 50, 100, 150ppm trên các đối tượng nấm.

**Hình 5.** Hiệu quả kháng nấm trên môi trường thạch PDA đối với nấm *Cercospora* sp., *Phanerochaete salminicolor* và *Corticium salmonicola* Berk. trong 72h.

Tương tự, nấm *Phanerochaete salminicolor* được xử lý với nanochitosan trên môi trường thạch PDA ở nồng độ 50 ppm là 71,90 mm (Hình 5 B50) so với mẫu đối chứng là 77,53 mm. Ở nồng độ 100 và 150 ppm đường kính tơ nấm phát triển lần lượt là 45,20 và 17,94 mm (Bảng 1). Cuối cùng, chủng *Corticium salmonicola* Berk. được xử lý với nanochitosan ở nồng độ 50 ppm trên môi trường thạch PDA có đường kính phát triển của tơ nấm là 43,29 mm (Hình 5 C50) sau 72 giờ, và giảm đáng kể 10,94 và 1,99 mm lần lượt ở nồng độ 100 và 150 ppm. Kết quả thử nghiệm trên các chủng nấm kiểm định cho thấy khi tăng dần nồng độ nanochitosan 50, 100 và 150 ppm thì đường kính tơ nấm giảm dần, điều này có nghĩa là khi tăng nồng độ nano thì khả năng kháng nấm của nanochitosan tăng lên.

Như vậy, hiệu quả kháng nấm của nanochitosan đối với *Cercospora* sp. và *Corticium salmonicola* Berk. là 97,85% và 97,08%, và thấp hơn đối với *Phanerochaete salminicolor* là 76,86% ở cùng nồng độ 150 ppm. Tuy nhiên, các nồng độ nanochitosan thử nghiệm cho thấy rằng đường kính phát triển của tơ nấm đều giảm so với lô đối chứng.

#### 4. KẾT LUẬN

Hạt nanochitosan – tripolyphosphate (TPP) đã được tổng hợp bằng phương pháp

tạo gel ion với kích thước hạt đo được từ 50 – 300 nm ở điều kiện pH là 4,5 và tỷ lệ khối lượng CTS/ TPP là 6:1. Các đặc tính hóa lý của hạt nanochitosan được đánh giá bằng nhiều phương pháp phân tích khác nhau như FE – SEM, TEM, DLS và nhiễu xạ tia X.

Hiệu quả kháng nấm của nanochitosan đối với chủng nấm *Cercospora* sp. và *Corticium salmonicola* Berk. cao trên 97%, và thấp hơn đối với *Phanerochaete salminicolor* là 76,86% ở cùng nồng độ 150 ppm.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. T.K. Cuc, T. T. K. Dzung and P. V. Cuong, Assessment of antifungal activity of turmeric essential oil-loaded chitosan nanoparticles. *J. Chem. Biol. Phys*, 4, pp. 2347–2356, 2014.
- [2] D. P. Chattopadhyay and M. S. Inamdar, Studies on synthesis, characterization and viscosity behaviour of nanochitosan, *Research Journal of Engineering Sciences ISSN*, 2278, pp. 9472, 2012.
- [3] Lê Hồ Khánh Hỷ, Nguyễn Thu Hồng, Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ, Đặng Quốc Minh, Phan Bảo Vy và Đoàn Thị Thiết, Một số đặc tính của nanochitosan có kích thước nhỏ được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel ion, *Tạp chí Đại học Cần Thơ*, 37, tr. 8-15, 2015.
- [4] A. F. Sahab, A. I. Waly, M. M. Sabbour and S. N. Lubna, Synthesis, antifungal and insecticidal potential of Chitosan (CS)-g-poly (acrylic acid)(PAA) nanoparticles against some seed borne fungi and insects of soybean, *Synthesis*, 8(2), pp. 589-598, 2015.
- [5] Trần Ngọc Hùng, Phan Trọng Nhân, Ngô Thị Lành, Nguyễn Thị Minh Thanh và Hoàng Thị Xuân, Sàng lọc một số chủng *Trichoderma* so đối kháng với *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây ớt trồng ở Bình Dương, *Tạp chí trường đại học Thủ Dầu Một*, (1), pp. 10 -16, 2014.
- [6] K. Vijayalakshmi, T. Gomathi and P. N. Sudha, Preparation and characterization of nanochitosan/sodium alginate/ microcrystalline cellulose beads, *Der Pharmacia Lettre*, 6 (4), pp. 65-77, 2014.
- [7] L. Qi and Z. Xu, Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 251, pp. 183-190, 2004.
- [8] Dương Thị Ánh Tuyết, Khảo sát quá trình điều chế hạt nano chitosan–tripolyphosphat, *Tạp chí Đại học Thủ Dầu Một*, (21), pp. 105-110, 2015.

#### **Tác giả chịu trách nhiệm bài viết:**

Nguyễn Thị Hiếu Trang

Trung Tâm Nghiên Cứu và Phát Triển Nông Nghiệp Công Nghệ Cao

Email: hieutrangbt08@gmail.com; hieutrangbtu08128@gmail.com