BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN

NGUYỄN VĨNH NGHI

NGHIÊN CỨU TẠO VẬT LIỆU NANO CHITOSAN, NANOCOMPOSITE CHITOSAN MANG KHÁNG SINH VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ KHÁNG MỘT SỐ VI KHUẨN GÂY BỆNH Ở NGƯỜI

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học
Mã số: 9420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Đắk Lắk – 2025

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

Phản biện 1: PGS.TS. Đoàn Văn Hồng Thiện

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Văn Minh

Phản biện 3: PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi Trường, Trường Đại học Tây Nguyên

Vào lúc … giờ … ngày … tháng … năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Tây Nguyên
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Vật liệu nano (nanomaterials) nhờ có kích thước siêu nhỏ (nanomet), diện tích bề mặt và điện thế hạt siêu lớn đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như khoa học vật liệu, sinh y học, nông nghiệp, và công nghiệp thực phẩm [60] [98-99][162] [141]. Trong lĩnh vực sinh y học, vật liệu nano dẫn truyền các loại thuốc như thuốc kháng ung thư, kháng sinh và hormon đến các mô và tế bào đích dễ dàng hiệu quả [76][100][104-106]. Vật liệu nano còn có khả năng phân hủy thành tế bào; phân hủy và ngăn ngừa sự hình thành màng sinh học; giải phóng các gốc oxy hoạt hóa (ROS) để phá hủy màng tế bào; phá hủy DNA và ngăn ngừa tổng hợp protein ở tế bào vi khuẩn. Vật liệu nano mang kháng sinh còn có một số lợi thế trong việc kháng lại các cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn như được bảo vệ, tránh bị phân hủy bởi các enzyme thủy phân của vi khuẩn; thâm nhập tốt hơn qua màng của vi khuẩn [17][30][43][92] [101] [147].

Chitosan là dẫn suất của chitin, một polymer tự nhiên mạch thẳng trong cấu trúc của vỏ tôm, cua, loài giáp xác, côn trùng và vi nấm. Chitosan có nguồn gốc tự nhiên, an toàn, tương hợp sinh học và phân huỷ sinh học. Chitosan là một polycation tự nhiên (poly-$NH4+$) nên có hoạt tính kháng khuẩn tự nhiên [4] [77][117] [119][148]. Ở trạng thái hạt nano, nano chitosan có hoạt tính kháng khuẩn tự nhiên mạnh hơn. Cơ chế kháng khuẩn tự nhiên của nano chitosan là do có điện tích dương lớn, dễ dàng liên kết với màng điện tích âm của vi khuẩn làm mất tính ổn định, thay đổi tính thấm của màng, giải phóng các chất từ trong tế bào đi ra ngoài; Ngoài ra, nó có khả năng liên kết với DNA, ức chế quá trình sao chép, phiên mã, dịch mã và tổng hợp enzyme; tạo ROS gây pháp vỡ DNA của vi khuẩn; liên kết với chuỗi vận chuyển điện tử, bơm cation $K+$, $Na+$ và $Ca2+$ ra khỏi tế bào [20][43] [90] [101] [107].

Để tăng cường khả năng kháng khuẩn và chống lại tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh hiện nay, hạt nano chitosan được ứng dụng để dẫn truyền một số thuốc kháng sinh như ampicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, chlortetracycline và gentamycin [13-14] [18-19] [52] [158] [168]. Costa và cs (2018) cũng đã nghiên cứu việc sử dụng hạt nano chitosan để ức chế vi khuẩn kháng kháng sinh như *Staphylococus aureus* kháng vancomycin (VRSA*), Enterococcus*

faecalis kháng vancomycin VREF, *Pseudomonas aeruginosa* R ATCC 700699, BAA-2365 và ATCC10145), *Acinetobacter baumannii* R [35]. La và cs (2014), Nguyen và cs (2017) cũng nghiên cứu tạo nano chitosan mang kháng sinh amoxicillin và ampicillin bằng phương pháp sấy phun để tăng khả năng kháng khuẩn *Streptococcus pneumonia* và *Staphyllococcus aureus* [88] [118]. Fan và cs (2022) cũng công bố sử dụng kháng sinh cephalosporin và chất ức chế β-lactamase (CNAI) được nạp vào các hạt nano chitosan [48]. Tuy nhiên, sử dụng hạt nano chitosan mang thuốc kháng sinh có hạn chế là chi phí giá thành cao, tính chất hạt không ổn định trong môi trường pH axit và do chitosan có cấu trúc mạch thẳng nên hiệu quả tải và giải phóng thuốc chưa cao như các polymer có cấu trúc mạng lưới. Các phương pháp tạo hạt nano chitosan trừ phương pháp sấy phun thường có hiệu suất thu hồi thấp và thường chứa các hoá chất không mong muốn nên hạn chế trong ứng dụng sinh y học và thực phẩm [165].

Tương tự như chitosan, tinh bột và cellulose cũng thuộc nhóm carbohydrate, là polymer tự nhiên, mạch thẳng, an toàn, phân huỷ sinh học và tương hợp sinh học. Hai polymer này cũng được ứng dụng nhiều trong sinh y học và thực phẩm. Nghiên cứu sử dụng tinh bột và cellulose như là chất mang để phân phối thuốc và các ứng dụng y sinh khác dưới dạng nanofilm, nanofiber. Tuy nhiên, các hạt nano tinh bột, cellulose hoặc nanofilm, nanofiber cũng có nhược điểm là tính chất cơ lý kém, cấu trúc không ổn định và bị enzyme tiêu hoá phân huỷ [25][44] [51][57][84][116].

Vì vậy, để giảm giá thành, tăng cường ổn định cấu trúc nano và tăng hiệu suất mang thuốc, chitosan một polycation (+) có thể tạo nanocomposite với một số polymer anion (-) khác như alginate, cellulose và tinh bột để tăng cấu trúc mạng lưới hoặc tạo đa lớp (multilayers) nhờ liên kết ion trái dấu [16][21][44][73][145]. Câu hỏi nghiên cứu đặt ra là: *1) Có thể tạo nanocomposite giữa chitosan với tinh bột hoặc cellulose bằng kỹ thuật sấy phun có cấu trúc và tính chất ổn định hay không ? 2) Hiệu quả mang kháng sinh và hiệu quả kháng một số vi khuẩn gây bệnh của Nanocomposite chitosan/tinh bột và nanocomposite chitosan/cellulose mang kháng sinh có được tăng cường so với kháng sinh và nanochitosan đơn thuần hay không ?*

Xuất phát từ những lý do trên, luận án thực hiện nghiên cứu: ***Nghiên cứu tạo vật liệu nano chitosan, nanocomposite chitosan***

mang kháng sinh và bước đầu đánh giá hiệu quả kháng một số vi khuẩn gây bệnh ở người.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được KLPT của chitosan phù hợp tạo nanochitosan và vật liệu nanocomposite có hiệu quả trong dẫn truyền thuốc kháng sinh và có tính kháng khuẩn cao trong điều kiện in vitro.

Tổng hợp được vật liệu nano composite chitosan/tinh bột và nano composite chitosan/cellulose với tỷ lệ phù hợp, có kích thước nanomet, tính chất và cấu trúc ổn định để tải kháng sinh bằng kỹ thuật sấy phun.

Đánh giá, so sánh được hiệu quả của kháng sinh khi được tải và dẫn truyền bởi nano chitosan, nanocomposite chitosan/tinh bột và nanocomposite chitosan/cellulose kháng một số vi khuẩn gây bệnh ở người trong điều kiện in vitro.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

Nội dung 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của khối lượng phân tử của chitosan đến tính chất và khả năng kháng khuẩn của nanochitosan mang kháng sinh amoxicillin.

Nội dung 2. Nghiên cứu tạo vật liệu nano composite chitosan/tinh bột và khả năng kháng khuẩn của nanocomposite chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin.

Nội dung 3. Nghiên cứu tạo vật liệu nanocomposite chitosan/cellulose và khả năng kháng khuẩn của vật liệu nanocomposite mang kháng sinh ampicillin.

4. Những đóng góp mới của luận án

Cung cấp dữ liệu quan trọng về chitosan có khối lượng phân tử 350-500 kDa là vật liệu phù hợp để tạo nano chitosan và mang kháng sinh amoxicillin để kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Hạt nano chitosan được tạo bằng phương pháp gel ion với TPP kết hợp với sấy phun có kích thước trung bình 300 nm, thế zeta +54 mV, giá trị MIC của nano chitosan kháng *S. pneumoniae* là 60-80 µg/mL. Khi kết hợp với kháng sinh amoxicillin, nano chitosan đã tăng cường khả năng kháng khuẩn kháng thuốc *S. pneumoniae*, giá trị MIC của nano chitosan/amoxicillin là 1µg/mL, thấp hơn 2 µg/mL so với chỉ sử dụng amoxicillin tự do trong điều kiện in vitro.

Tạo được nanocomposite chitosan/tinh bột tạo bằng phương pháp sấy phun để mang kháng sinh ampicillin. Hạt nanocomposite có dạng hình cầu, đồng nhất và cấu trúc ổn định, có cấu trúc mạng lưới nhờ hình thành các liên kết hydro, kích thước hạt trung bình từ 300-500 nm. Tỷ lệ thích hợp để tạo nanocomposite giữa chitosan và tinh bột là 1:1 (C1S1) hoặc 1:2 (C1S2), thế zeta cao từ +71 mV đến +80 mV. Hiệu suất mang kháng sinh ampicillin của nanocomposite chitosan/tinh bột từ 70-77% cao hơn so với nanochitosan và nano tinh bột. Hạt nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampiciline thể hiện hoạt tính kháng và diệt khuẩn *E. coli* và *S. aureus* cao hơn và ổn định hơn so với ampicillin tự do hoặc khi được bao gói trong nanochitosan. MIC của nano composite chitosan/tinh bột (C1S1+Amp và C1S2+Amp) từ 3,0-3,2 µg/mL và MBC biến thiên 5,2-5,8 µg/mL. Nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin bằng phương pháp sấy phun là vật liệu mang và dẫn truyền kháng sinh hiệu quả trong điều kiện in vitro.

Tạo được Nanocomposite chitosan/cellulose tạo bằng phương pháp kết hợp gel ion giữa hai polymer chitosan và CM-Cellulose có điện tích trái dấu kết hợp với sấy phun là phương pháp đơn giản và hiệu quả. Hạt nanocomposite chitosan/cellulose có dạng hình cầu đều, bề mặt ổn định, có cấu trúc mạng lưới, kích thước hạt trung bình từ 1200-1300 nm, thế zeta biến thiên từ +70 mV đến +90 mV, hiệu suất thu hồi đạt > 70%. Tỷ lệ chitosan và cellulose thích hợp tạo nanocomposite là 2:1 (C2M1) và 1:1 C1M1). Hiệu suất vi bao kháng sinh ampicillin (LE%) từ 75,8-82,1%. Tỷ lệ chitosan và cellulose thích hợp để tạo nanocomposite là C2M1 và C1M1. MIC/MBC với *S. aureus* và *E. coli* biến thiên từ 3,0-3,2 µg/mL và 5,2-5,6 µg/mL, tỷ lệ MBC/MIC là 1,72. Nano composites chitosan/cellulose là vật liệu tiềm năng, hiệu quả để mang và dẫn truyền thuốc kháng sinh ampicillin để kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* và *E. coli* trong điều kiện in vitro.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Vật liệu nano và ứng dụng trong sinh y học

1.1.1.Các dạng vật liệu nano: Giới thiệu các dạng vật liệu nano vô cơ, vật liệu nano hữu cơ.

1.1.2. Ứng dụng của vật liệu nano trong điều trị vi khuẩn kháng thuốc: Vật liệu nano (Nanomaterials) hay công nghệ nano (Nanotechnology) là một trong những giải pháp đầy hứa hẹn để chống lại tính kháng

thuốc của vi khuẩn gây bệnh. Trình bày ưu điểm, nhược điểm và thách thức của vật liệu nano khi ưgs dụng trong sinh y học.

1.1.3. Cơ chế phân tử về tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh: Về cơ bản cơ chế phân tử liên quan tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh đều do hoạt động của gen. Nguồn gốc, xuất xứ và sự đa dạng của các gen này trong tự nhiên rất phức tạp.

1.2. Tổng quan về chitosan và ứng dụng trong sinh y học

1.2.1. *Giới thiệu về chitosan*

Chitosan là một polysaccharide bao gồm các đơn phân là β-D-glucosamine (GlcN). Chitosan được tìm thấy trong tự nhiên ở một số vi sinh vật, nấm men và nấm. Sự xuất hiện của nó ít phổ biến hơn chitin nên chủ yếu chitosan được tạo ra bằng cách deacetyl hóa chitin. Chitin là thành phần chủ yếu của vỏ côn trùng, tôm cua, giáp xác. Nó cũng được phát hiện trong nấm và địa y. Trong các mô động vật chitin liên kết với protein và calcium cacbonate. Chitin, chitosan là biopolymer phổ biến thứ hai trong tự nhiên, chỉ sau cellulose.

1.2.2. *Các phương pháp tạo hạt nano chitosan*

Có nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để chế tạo nano và micro chitosan. Việc lựa chọn một phương pháp phụ thuộc vào các yếu tố như yêu cầu về kích thước hạt, độ tích điện zeta potential, độ bền nhiệt độ và hóa chất của chất hoạt động, sự ổn định của sản phẩm cuối và sự kết hợp độc tố còn lại với sản phẩm cuối. Theo Sulnin (2004) và Yanat (2021) [165] có năm phương pháp chủ yếu để tạo hạt nano và micro chitosan là: Phương pháp khâu mạch nhũ tương (emulsion cross-linking); Phương pháp giọt tụ/kết tủa (coacervation/precipitation); Phương pháp sấy phun (spray-drying); Phương pháp tạo gel ion (ionic gelation) và Phương pháp rây (sieving method).

1.2.3. *Ứng dụng của chitosan, nanochitosan trong y dược học*

+ Sự hấp thu và vận chuyển nano chitosan trong mô và tế bào

Sự hấp thu qua tế bào của các hạt nano chitosan xảy ra bằng quá trình chuyển tế bào (Transcytosis), một quá trình trong đó các chất mang được hấp thụ bởi các tế bào ruột hoặc tế bào M, giống như sự xâm nhập của mầm bệnh (Behrens và cs 2002) [28].

+ Cơ chế kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Theo Murugesan (2020) cơ chế kháng khuẩn của nano chitosan phụ thuộc một số yếu tố là [107]: 1) Đối tượng vi khuẩn là vi khuẩn gram âm hay vi khuẩn gram dương 2) giai đoạn phát triển của vi khuẩn 3) Thế zeta potential 4) Nồng độ nano chitosan 5) pH môi trường 6) khối lượng phân tử và mức độ acetyl hoá (DA%) của chitosan.

+ Ứng dụng của nano chitosan trong ly giải chậm thuốc kháng sinh

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng các hạt nano chitosan là vật liệu nano vận chuyển và phân phối thuốc rất tiềm năng. Chúng có khả năng bảo vệ thuốc khỏi sự phân hủy của các enzyme trong đường ruột. Với kích thước nhỏ, chúng có thể thâm nhập sâu vào cơ thể, đưa thuốc đến đúng mô và tế bào đích để nâng cao hiệu quả điều trị.

1.3. Tinh bột và ứng dụng trong sinh y học

1.3.1. *Cấu trúc và tính chất*

1.3.2. *Tinh bột sử dụng như là vật liệu sinh học*

1.3.3. *Nano tinh bột (Starch nanoparticles, SNP)*

1.3.4. *Nanofillers*

1.4. Tổng quan cellulose và ứng dụng trong sinh y học

1.4.1. *Cấu trúc cellulosse*

1.4.2. *Một số ứng dụng của cellulose trong sinh y học*

1.5. Tổng quan về một số vi khuẩn gây bệnh trên người

1.5.1. *Staphylococcus aureus*

1.5.2. *Streptococcus pneumoniae*

1.5.3. *Escherichia coli*

1.6. Tổng quan về kháng sinh

1.6.1. *Kháng sinh amoxicillin*

1.6.2. *Kháng sinh ampicillin*

CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1.Đối tượng nghiên cứu

-Đối tượng: Chitosan và các chủng kháng thuốc *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*.

-*Vật liệu hoá chất:* Chitosan sản phẩm của Sigma (Hoa Kỳ), có khối lượng phân tử (Mw) trung bình khác nhau từ 350, 500, 640 và 750 kDa, Mức độ deacetyl hoá (DD) từ > 75%.

Tinh bột hòa tan, (Hi-AR™/ACS) và Nutrient Broth là sản phẩm của Himedia, Ấn Độ. Môi trường Brain heart infusion broth (BHI) của (Difco Laboratories, Detroit, MI, Hoa Kỳ). Sodium Carboxymethyl cellulose (CMC), Sodium Tripolyphosphate (TPP) là các hóa chất tinh khiết của Merck (Đức). Amoxicillin trihydrate, ampicillin sulfate (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ).

2.2.Nội dung nghiên cứu

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của khối lượng phân tử của chitosan đến tính chất và khả năng kháng khuẩn của nanochitosan mang kháng sinh amoxicillin.

+ Nghiên cứu tạo vật liệu nano composite chitosan/tinh bột và khả năng kháng khuẩn của nanocomposite chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin.

+ Nghiên cứu tạo vật liệu nanocomposite chitosan/cellulose và khả năng kháng khuẩn của vật liệu nanocomposite mang kháng sinh ampicillin.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của khối lượng phân tử của chitosan đến tính chất và khả năng kháng khuẩn của nanochitosan mang kháng sinh amoxicillin: Mục tiêu của nghiên cứu là xác định KLPT chitosan phù hợp, có hoạt tính kháng khuẩn cao, dễ ứng dụng trong thực tiễn cho các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

- Phương pháp tạo nano chitosan bằng gel ion với TPP và sấy phun.
- Phương pháp nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của nano chitosan có khối lượng phân tử khác nhau
- Ảnh hưởng của nano chitosan mang kháng sinh amoxicillin đến khả năng kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae*.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tạo vật liệu nano composite chitosan/tinh bột và khả năng kháng khuẩn của nano composite chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin:

- Phương pháp chế tạo nanocomposite chitosan/tinh bột

- Phương pháp tạo nanocomposite chitosan với tinh bột và Carboxymethyl cellulose (CMC).

- Phương pháp nạp ampicillin trong cấu trúc hạt nanocomposite chitosan/tinh bột và nano/microcomposite chitosan/cellulose.

- Động học giải phóng ampicillin của nanocomposite chitosan/tinh bột và nanocomposite chitosan/cellulose.

- Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của nanocomposite chitosan/tinh bột và cellulose mang ampicillin.

- Phương pháp xác định giá trị MIC/MBC đối với các vi khuẩn gây bệnh [3]; [134].

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích ANOVA một yếu tố theo phần mềm SPSS 20.0. Phân tích dữ liệu: Phân tích phương sai một chiều kết hợp với kiểm định LSD ($p < 0,05$).

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

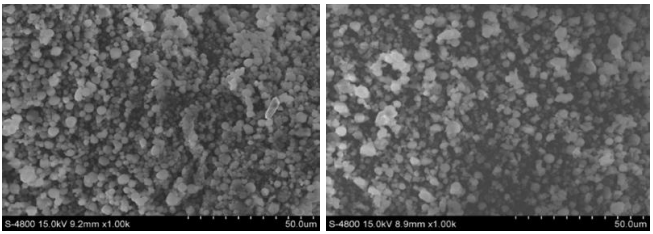
3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của khối lượng phân tử của chitosan đến tính chất và khả năng kháng khuẩn của nanochitosan mang kháng sinh amoxicillin

3.1.1. Ảnh hưởng khối lượng phân tử chitosan đến tính chất hạt nano chitosan tạo bằng phương pháp gel ion kết hợp với sấy phun

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của khối lượng phân tử đến kích thước và điện thế hạt nano chitosan tạo bằng phương pháp gel ion với sấy phun

Khối lượng phân tử Chitosan	Tính chất hạt nano chitosan		
	Kích thước hạt nano trung bình, nm	Điện thế zeta potential, mV	Hiệu suất hấp phụ (%)
350 kDa	342 ± 28^{d}	$+54 \pm 3,5^{a}$	$78,5 \pm 3,1^{a}$
500 kDa	435 ± 35^{c}	$+47 \pm 4,1^{b}$	$73,6 \pm 2,8^{b}$
620 kDa	790 ± 36^{b}	$+39 \pm 3,2^{c}$	$69,5 \pm 3,4^{c}$
750 kDa	1070 ± 67^{a}	$+32 \pm 3,4^{c}$	$62,7 \pm 2,6^{d}$

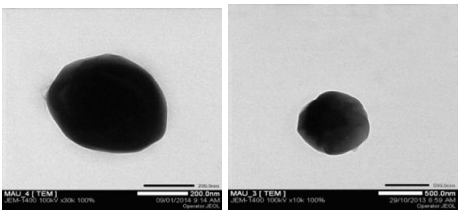
Bảng 3.1 Cho thấy kích thước trung bình của hạt nano chitosan tăng dần từ 342 nm-1070 nm khi khối lượng phân tử chitosan thay đổi từ 350-750 kDa (130 cps - 1200 cps). Ngược lại, thế zeta potential của hạt nano chitosan giảm dần từ +54 mV xuống +32 mV khi tăng khối lượng phân tử của chitosan.



A. B

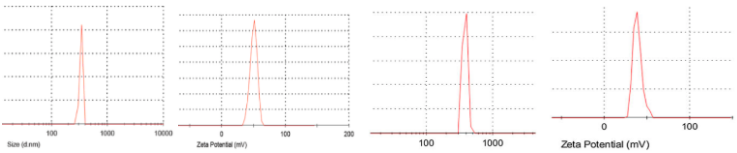
Hình 3.1. Ảnh SEM hạt nano chitosan với khối lượng phân tử 500 kDa (A), và 750 kDa (B) (15 kV, x1000 lần)

Kết quả về hình thái, kích thước hạt và phân bố kích thước hạt nano chitosan tạo bằng phương pháp tạo gel ion với TPP và sấy phun được ghi nhận ảnh chụp SEM (Hình 3.1) và ảnh chụp TEM (Hình 3.2).



A B

Hình 3.2: Ảnh chụp TEM (JEM 1400) của hạt nano chitosan 350 kDa (A) và 500 kDa (B)

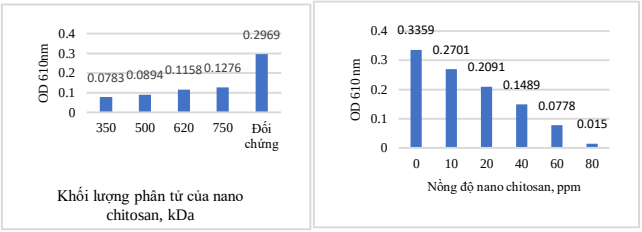


(A) (B)

Hình 3.3. Phân bố kích thước hạt và thế zeta potential của hạt nano chitosan 350 kDa (A) và 500 kDa (B)

Phân bố kích thước hạt (Hình 3.3 A) cho thấy một đỉnh duy nhất và hẹp chứng tỏ kích thước hạt phân bố rất tập trung và chứng tỏ hạt có kích thước đồng đều. Điều này cũng liên quan đến thế zeta potential cũng cho kết quả tương tự (Hình 3.3 B).

3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của khối lượng phân tử đến khả năng kháng khuẩn Streptococcus pneumoniae của nano chitosan

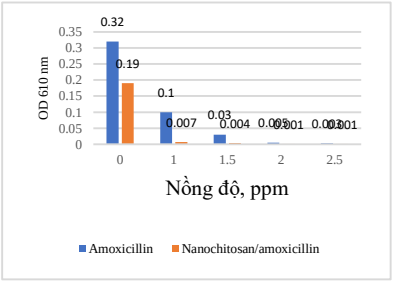


A B

Hình 3.4. Ảnh hưởng của khối lượng phân tử và nồng độ nano chitosan đến khả năng kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae*

Kết quả hình 3.4 A cho thấy khối lượng phân tử hạt nano chitosan càng nhỏ thì khả năng kháng khuẩn càng lớn. Giá trị độ đục của môi trường nuôi cấy vi khuẩn ở OD 610nm tăng dần từ 0,063 lên 0,127 so với đối chứng là 0,296. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê $p<0,05$. Kết quả này là do khối lượng phân tử chitosan càng nhỏ thì kích thước hạt càng bé, diện tích bề mặt và thế zeta potential càng lớn. Các tính chất này liên quan trực tiếp đến khả năng kháng khuẩn của chitosan do điện tích dương của chitosan sẽ liên kết và phá huỷ màng tế bào vi khuẩn.

3.1.3. Đánh giá khả năng kháng khuẩn Streptococcus pneumoniae của phức hợp nano chitosan/amoxicillin



Hình 3.5. Hiệu quả kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae* của phức hợp nano chitosan/amoxicillin

Để tăng cường khả năng kháng phế cầu khuẩn kháng thuốc, nano chitosan có khối lượng phân tử 500 kDa có nồng độ 6 ppm được hấp phụ với kháng sinh amoxicilin với các nồng độ từ 0, 1, 1,5, 2,0, và 2,5 ppm theo thể tích môi trường nuôi cấy. Hiệu suất hấp phụ kháng sinh

của nano chitosan là 84,4-90,5%. Kết quả ghi nhận trong Hình 3.5 cho thấy khi phối hợp với nano chitosan hoạt tính kháng khuẩn của kháng sinh đã được cộng hưởng và tăng lên. Trị số MIC của nano chitosan/amoxicillin khoảng 1,0 ppm, thấp hơn so với amoxicilin là 2,0 ppm.

3.2. Nghiên cứu tạo vật liệu nano chitosan/tinh bột composite và khả năng kháng khuẩn của nano chitosan/tinh bột composite mang kháng sinh ampicillin

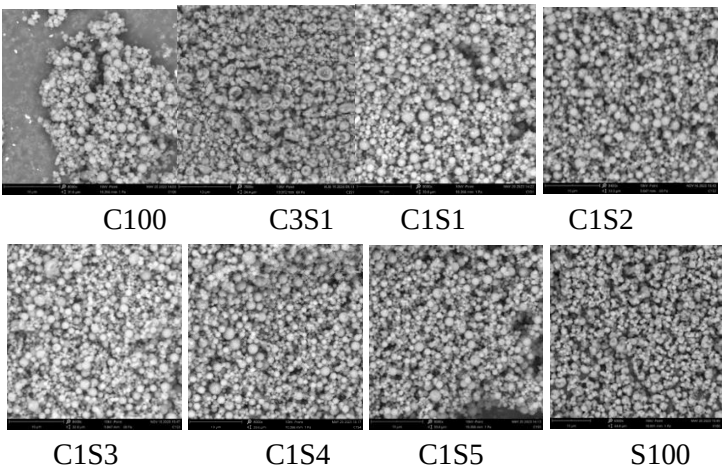
3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan và tinh bột đến tính chất của nano chitosan/tinh bột composite bằng phương pháp sấy phun

Kết quả về ảnh hưởng tỷ lệ chitosan/tinh bột đến các tính chất của nanocomposite chitosan/tinh bột trong Bảng 3.2 và Hình 3.6.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan/tinh bột đến tính chất của nano chitosan/tinh bột composite bằng phương pháp sấy phun

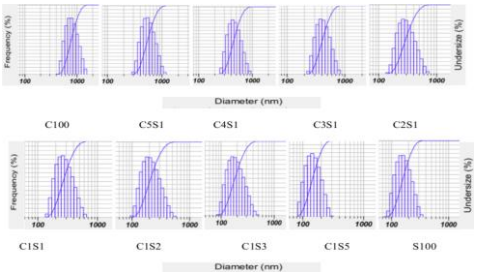
TT	Mẫu	Tỷ lệ chitosan/tinh bột (w/w)	Thế Zeta potential (mV)	Kích thước hạt trung bình (nm)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	C100	1:0	+67.67±0.93^{d}	816.9±24.5^{a}	75.49±0.35
2	C5S1	5:1	+93.07±0.76^{a}	873.7±31.2^{a}	75.13±0.04
3	C4S1	4:1	+91.07±0.32^{a}	655.1±20.2^{b}	75.15±0.05
4	C3S1	3:1	+88.73±0.15^{b}	571.8±17.9^{b}	75.14±0.05
5	C2S1	2:1	+87.47±0.67^{b}	372.9±16.3^{c}	75.09±0.73
6	C1S1	1:1	+80.33±0.95^{c}	372.4±17.4^{c}	75.16±0.06
7	C1S2	1:2	+71.37±1.01^{d}	281.0±12.3^{d}	75.07±0.08
8	C1S3	1:3	+54.43±1.27^{e}	190.6±2.87^{e}	75.16±0.13
9	C1S4	1:4	+45.97±0.61^{f}	140.4±3.58^{e}	75.23±0.09
10	C1S5	1:5	+29.47±0.21^{g}	122.0±4.89^{e}	75.22±0.09
11	S100	0:1	-19.67±0.21^{h}	133.2±4.32^{e}	75.24±1.78
12	Amp	0	-0.10±0.0	-	-

**a, b, c, d chỉ sự khác biệt thống kê theo các giá trị trong cột với ($p<0.05$).*

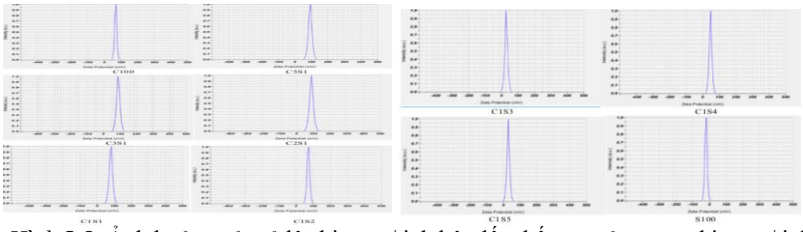


Hình 3.6. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử quyét (SEM) của nanocomposite chitosan/tinh bột với các tỷ lệ khác nhau (SEM, Phenom ProX, Thermo, USA, 8000x; at 10 kV). C: chitosan; S: tinh bột.

Kết quả Bảng 3.2, Hình 3.7 cho thấy phân bố kích thước của nano chitosan/tinh bột composite hẹp, nghĩa là kích thước của các hạt nano khá đồng đều. Đặc điểm này ảnh hưởng đến diện tích bề mặt hạt nano và khả năng xâm nhập của hạt nano vào tế bào. Phân bố kích thước hạt các mẫu đều tuân theo phân bố Gause và phụ thuộc vào tỷ lệ chitosan: tinh bột. Tỷ lệ tinh bột cao hơn trong nanocomposite thì phân bố kích thước hạt nano chitosan/tinh bột composite càng nhỏ. Ví dụ: Mẫu C1S1 (Chitosan/tinh bột 1:1) có phân bố kích thước hạt từ 140-700 nm; Mẫu C1S2 (Chitosan:tinh bột 1:2) có phân bố kích thước hạt thấp hơn từ 100-600 nm; C1S3 (Chitosan:tinh bột 1:3) từ 90-500 nm và C1S5 (Chitosan:tinh bột 1:5) có phân bố hẹp hơn từ 80-300 nm



Hình 3.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan/tinh bột đến phân bố kích thước nano chitosan/tinh bột composite (Nanosizer SZ100, Horiba, Nhật Bản, ở 25^{o}C)

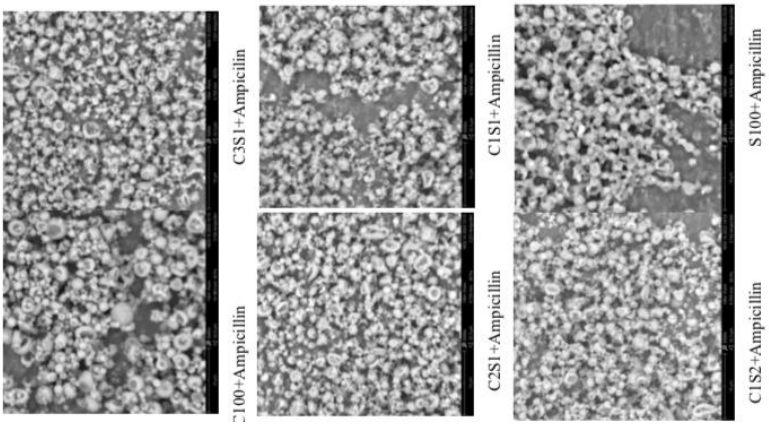


Hình 3.8. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan/tinh bột đến thế zeta của nano chitosan/tinh bột composite (Nanosizer SZ100, Horiba, Japan, ở 25^{O}C)

Ngược lại với phân bố kích thước hạt, giá trị thế zeta của nanocomposite chitosan/tinh bột tuân theo quy tắc ngược lại. Tỷ lệ chitosan trong composite càng cao thì thế zeta càng cao (Hình 3.8).

3.2.2. Ảnh hưởng của bao gói kháng sinh ampicillin đến đặc điểm tính chất của hạt nano chitosan/tinh bột composite tạo bằng phương pháp sấy phun

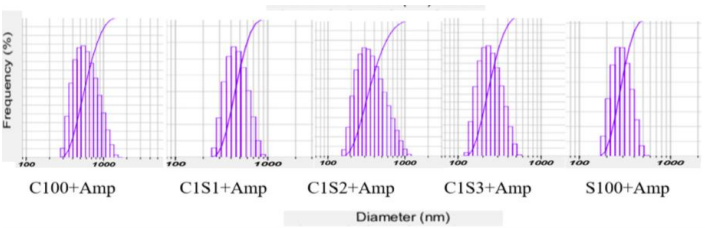
Khi kết hợp với ampicillin ở nồng độ 7,5 µg/mL, kết quả cấu trúc bề mặt của nanocomposite chitosan/tinh bột có những thay đổi nhất định so với chitosan/tinh bột nanocomposite không nạp ampicillin (Hình 3.9). Ảnh chụp SEM cho thấy khi bao gói ampicillin vào nanocomposite, tất cả các mẫu đều có sự thay đổi như kích thước lớn hơn và cấu trúc lõm xuất hiện nhiều hơn trên bề mặt.



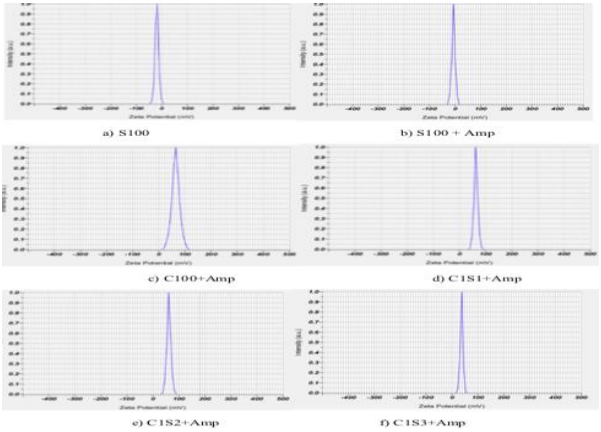
Hình 3.9. SEM của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin (SEM, Phenom ProX, Thermo, Hoa Kỳ; 8000x, 10kV).

Bảng 3.3. Tính chất của nano chitosan/tinh bột composite khi tải ampicillin

Mẫu	Thế zeta (mV)	Kích thước trung bình (nm)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hiệu suất bao gói (%)
C100-Ampicillin	64,7±1.42^{b}	1020,8±32.4^{a}	72,84±0.34	65,5±2.87^{d}
C3S1-Ampicillin	73,6±1.83^{a}	661,6±23.5^{b}	71,07±0.25	70,7±2.93^{c}
C2S1-Ampicillin	65,2±1.18^{b}	580,3±22.7^{c}	72,11±1.67	71,5±3.08^{c}
C1S1-Ampicillin	63,2±0.91^{b}	583,9±25.2^{c}	72,56±1.54	75,5±3.21^{b}
C1S2-Ampicillin	61,3±0.97^{b}	566,4±20.5^{c}	71,12±1.75	77,3±2.97^{a}
C1S3-Ampicillin	37,2±1.34^{c}	418,0±17.8^{d}	72,18±0.96	75,3±3.15^{b}
S100-Ampicillin	-6,3±0.29^{d}	603,4±18.5^{c}	72,05±1.45	60,0±3.68^{e}



Hình 3.10. Phân bố kích thước của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin (Nannosize SZ 100, Horiba, Nhật Bản)

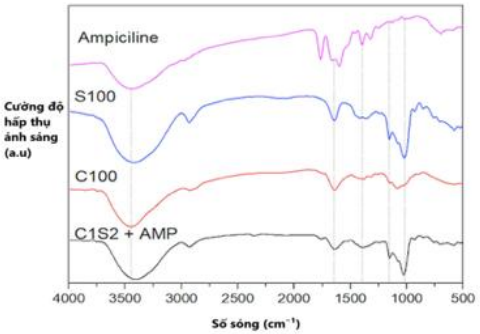


Hình 3.11. Thế zeta potential của nano chitosan/tinh bột composite mang kháng sinh ampicillin (Nannosize SZ 100, Horiba, Nhật Bản)

Kích thước trung bình và thế zeta của nanocomposite chitosan/tinh bột thay đổi khi nạp ampicillin (Bảng 3.3). Kích thước trung bình tăng ở mẫu C100 (816,9 nm) lên đến 1020 nm (C100+Amp); 133 nm (S100) lên đến 603 nm (S100 + Amp); 372 nm (C1S1) lên đến 583,9 nm (C1S1+Amp); 191 nm (C1S3) lên đến 418 nm (C1S3+Amp). Kết quả cho thấy kích thước trung bình của nanocomposite nạp ampicillin lớn hơn và giá trị thế zeta của chúng thấp hơn nanocomposite không nạp ampicillin (Bảng 3.2; Bảng 3.3). Hầu hết các mẫu nano chitosan/tinh bột composite mang kháng sinh ampicillin giảm nhẹ thế zeta potential nhưng vẫn mang điện tích (+), biến thiên từ +37,2 đến +73,6 mV. Tính chất này có lợi cho sự gắn kết của nano chitosan/tinh bột composite mang ampicillin với màng tế bào vi khuẩn mang điện tích âm.

Phổ FTIR của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin (C1S2+AMP) chỉ ra rằng tất cả các đỉnh đặc trưng nhất đều liên quan đến ampicillin, tinh bột và chitosan là các thành phần trong hỗn hợp như các đỉnh ở khoảng 3450 cm-1 (kéo dài -NH của amid trong ampicillin; và kéo dài -OH của ampicillin, tinh bột và chitosan) đã dịch chuyển về 3407cm-1 và trở nên rộng hơn cho thấy sự hình thành và gia tăng liên kết hydro giữa hai polymer là chitosan và tinh bột và giữa nano chitosan/tinh bột composite với ampicillin; ở khoảng 2900 cm-1 (kéo dài -CH của ampicillin, tinh bột và chitosan); Đỉnh ở 1762 cm−1 cho thấy sự kéo dài của nhóm carbonyl (C=O) của vòng β-lactam; đỉnh 1660 cm-1 và 1599 cm-1 là sự uốn cong của -NH2 trong ampicillin đã dịch chuyển về 1640 cm-1 và biến mất trong phổ nanocomposite (C1S2+AMP). Điều này chứng tỏ đã hình thành liên kết hydro giữa -NH2 của ampicillin và -OH của chitosan và tinh bột [158]. Tóm lại, phổ FTIR của nanocomposite chứa ampicillin (C1S2+AMP) chứng minh rằng các thành phần của nanocomposite bao gồm ampicillin, tinh bột và chitosan. Phân tích sự biến đổi của các đỉnh cũng cho thấy sự hình thành các liên kết hydro giữa chitosan và tinh bột và giữa nanocomposite (C1S2) với AMP. Liên kết hydro là liên kết yếu có vai trò quan trọng trong ổn định cấu trúc của nanocomposite, đồng thời góp phần làm tăng hiệu suất mang và làm chậm sự giải phóng của kháng sinh. Kết hợp với sự biến đổi thế zeta của nanocomposite chitosan/tinh bột và FT-IR có thể nhận định rằng nanocomposite chitosan/tinh bột có cấu trúc của nanocomposite chitosan/tinh bột hai

lớp, có cấu trúc mạng lưới giữa hai polymer và hình thành các liên kết hydro trong mạng lưới của chitosan và tinh bột.

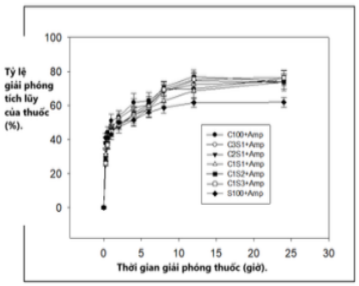


Hình 3.12 FTIR của ampicillin vi bao trong hạt nanocomposite chitosan/tinh bột (FTIR, Alpha, Brucker, Hoa Kỳ)

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin được nạp vào nanocomposite chitosan/tinh bột lên khả năng ức chế Staphyllococcus aureus

3.2.3.1. Động học giải phóng kháng sinh ampicillin từ nanocomposite chitosan/tinh bột

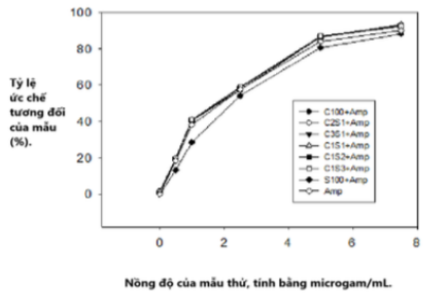
Kết quả thể hiện trong Bảng 3.2 và Hình 3.13 chỉ ra rằng hiệu quả bao gói của các hạt nano chitosan (C100+Amp) là 65,5% và chỉ đạt 60,0% với các hạt nano tinh bột (S100+Amp). Động học giải phóng của ampicillin (Hình 3.13) cũng phát hiện ra rằng công thức C100+Amp giải phóng nhanh khoảng 50% hàm lượng ampicillin trong vòng 1 giờ.



Hình 3.13. Động học giải phóng ampicillin từ nanocomposite chitosan/tinh bột tải ampicillin. (ampicillin 7,5 µg/mL, trong dung dịch đệm phosphat, pH=7,0 trong 24 giờ; các giá trị trong hình là giá trị trung bình ba lần lặp lại ± SD).

3.2.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin được nạp vào nanocomposite chitosan/tinh bột đến khả năng ức chế S. aureus

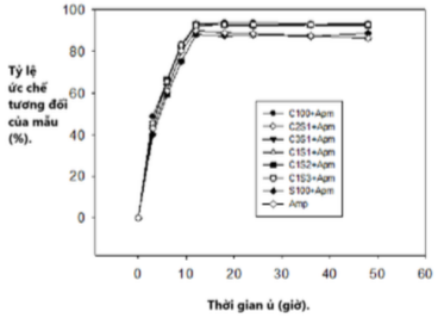
Kết quả thu được (Hình 3.14) cho thấy tác dụng kháng khuẩn đối với *S. aureus* tăng lên khi tăng nồng độ ampicillin từ 0,5-7,5 µg/mL. *S. aureus* bị ức chế 50% ở nồng độ khoảng 2,0 µg/mL ampicillin.



Hình 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin được nạp vào nanocomposite chitosan/tinh bột đến khả năng ức chế *S. aureus*

Ở nồng độ 7,5 µg/mL, tỷ lệ ức chế liên quan của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin dao động từ 93,2 đến 94,21% trong khi ampicillin chỉ là 88,96%.

3.2.3.3. Ảnh hưởng nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin đến khả năng ức chế Staphylococcus aureus



Hình 3.15. Ảnh hưởng của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin đến hoạt tính ức chế *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* được nuôi cấy trong Nutrient Broth, pH=7,0; ở 37°C trong 48 giờ và lắc với tốc độ 120 rpm; các giá trị trong hình là giá trị trung bình của ba lần lặp lại ± SD).

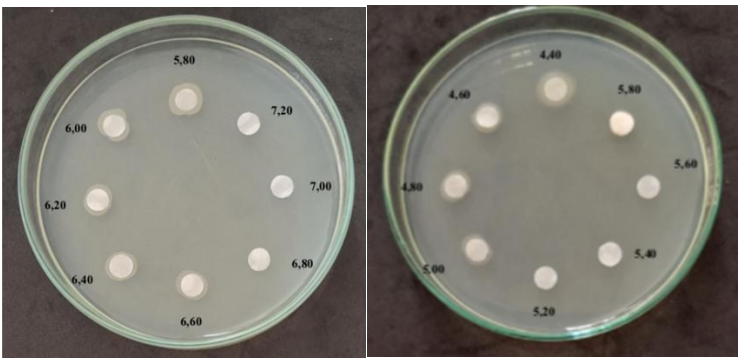
Kết quả (Hình 3.15) cho thấy tất cả các mẫu nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin (trừ hạt nano tinh bột S100) đều ức chế từ 92,3-94,8% sự phát triển của MRSA, cao hơn so với chỉ sử dụng ampicillin (88,4%) sau 24 giờ.

Trong trường hợp chỉ sử dụng ampicillin, sự ức chế là 89,2% sau 12 giờ, sau đó giảm dần xuống còn 88,8% sau 18 giờ, 88,4% sau 24 giờ và 87,2% sau 48 giờ.

3.2.3.4. Giá trị MIC và MBC của nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin đối với Staphylococcus aureus

Bảng 3.4. Giá trị MIC và MBC của nanocomposite chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin trên *S. aureus*

STT	Công thức	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Tỷ lệ MBC/MIC
1	C100 + Amp	$3,53^{b} \pm 0,12$	$6,47^{c} \pm 0,12$	1,83
2	C2S1 + Amp	$3,07^{a} \pm 0,12$	$5,27^{a} \pm 0,12$	1,72
3	C1S1 + Amp	$3,13^{a} \pm 0,12$	$5,67^{b} \pm 0,12$	1,81
4	C1S2 + Amp	$3,27^{a} \pm 0,12$	$5,80^{b} \pm 0,00$	1,77
5	S100 + Amp	$4,07^{c} \pm 0,12$	$6,87^{d} \pm 0,12$	1,70
6	Amp	$3,93^{c} \pm 0,12$	$6,80^{d} \pm 0,00$	1,73



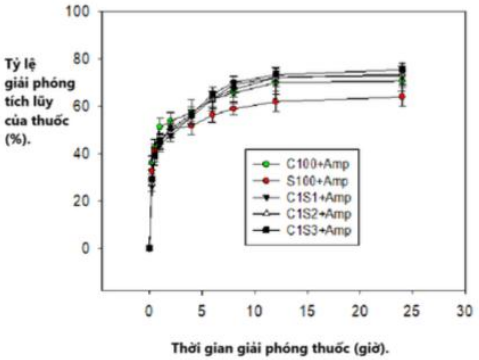
Hình 3.18. Giá trị MBC của ampicillin (trái) và C2S1+Amp (phải) với *S. aureus*

Giá trị MIC/MBC của các hạt nano composite chitosan/tinh bột chứa ampicillin (Bảng 3.4), Hình 3.17 và Hình 3.18 cho thấy: Giá trị MIC của Amp là 3,93 µg/mL và MBC là 6,80 µg/mL đối với *S. aureus* và nanochitosan (C100 + Amp) giảm xuống 3,53 µg/mL và 6,47 µg/mL, sự khác biệt giữa hai công thức này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

3.2.4. Ảnh hưởng kháng sinh ampicilin bao gói trong nanocomposite chitosan/tin bột đến khả năng kháng khuẩn *Escherichia coli*

3.2.4.1. Động học ly giải kháng sinh ampicillin bao gói trong nano chitosan/tinh bột composite kháng E. coli

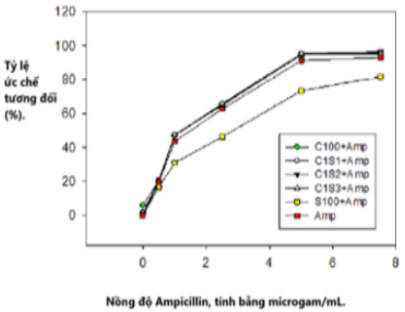
Kết quả thể hiện trong Hình 3.19 cho thấy hiệu suất bao gói (LE) của nanocomposite chitosan/tinh bột đạt từ 75,3 đến 77,3%. Con số này cao hơn đáng kể so với hiệu suất bao gói của hạt nano chitosan (C100) là 65,8% và hạt nano tinh bột (S100) là 59,9%.



Hình 3.19. Động học giải phóng ampicillin khỏi nanocomposite nano composite chitosan/tinh bột (trong dung dịch đệm phosphat ở pH=7,0; 25^o C)

Nghiên cứu chỉ ra rằng cấu trúc mạng lưới được hình thành bởi hỗn hợp chitosan mạch thẳng, điện tích dương và tinh bột có cấu trúc mạng lưới, điện tích âm đã tạo điều kiện cho việc bao gói ampicillin tốt hơn so với các hạt nano chitosan hoặc tinh bột riêng lẻ.

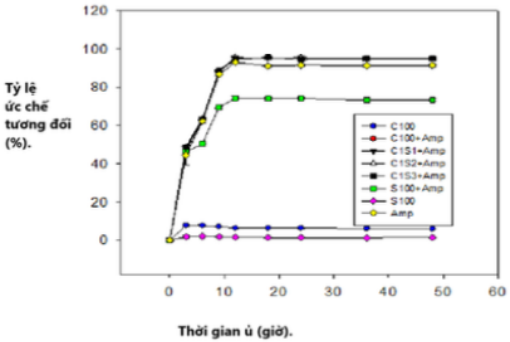
3.2.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin được nạp vào nano chitosan/tinh bột đến hoạt tính kháng khuẩn đối với E. coli



Hình 3.20. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin được nạp vào nano chitosan/tinh bột composite đến tỷ lệ ức chế tương đối đối với *E. coli* (Nutrient broth, ở 30^o C, 12h)

Kết quả ở Hình 3.20 cũng cho thấy ampicillin được bao gói trong hạt nano tinh bột (S100+Amp), tỷ lệ ức chế vi khuẩn đối với E. coli thấp hơn ampicillin tự do và ampicillin trong chất mang nanocomposite chitosan/tinh bột.

3.2.4.3. Ảnh hưởng của ampicillin được nạp vào nanocomposite chitosan/tinh bột và thời gian ủ lên hoạt tính kháng khuẩn E. Coli



Hình 3.21. Tác dụng của nanocomposite chitosan/tinh bột chứa ampicillin lên hoạt tính kháng khuẩn *E. coli* trong ống nghiệm (trong Nutrient Broth, ở 30^{O}C, 120 vòng/phút trong 48 giờ)

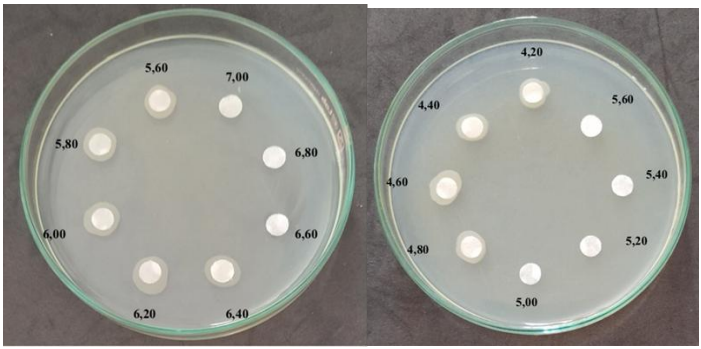
Kết quả Hình 3.21 cũng cho thấy mẫu nano chitosan (C100) có hoạt tính kháng khuẩn *E.coli* nhưng thấp, do nồng độ nano chitosan trong môi trường nuôi cấy thấp. Ngoài ra, nano tinh bột (S100) không có hoạt tính kháng khuẩn *E. coli*.

3.2.4.4. MIC/MBC của nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin với vi khuẩn Escherichia coli

Tương tự kết quả ở mục 2.2.4.4 về giá trị MIC/MBC của nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin, kết quả Bảng 3.5, Hình 3.22 và Hình 3.23. cho thấy MIC/MBC của kháng sinh ampcillin với *E. coli* là 4,0 µg/mL và 6,6 µg/mL giảm xuống ở mẫu nanochitosan C100+Amp là 3,2 µg/mL và 6,3 µg/mL. Điều này chứng tỏ nanochitosan cũng có tác dụng kháng khuẩn *E. coli*. Giá trị MIC/MBC của các mẫu nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin (C2S1+Amp) giảm xuống 3,0 µg/mL và 5,0 µg/mL thấp hơn nhiều so với chỉ có ampicillin đơn thuần hoặc nanochitosan mang ampiccilin và sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$. Kết quả cũng cho thấy mẫu nano tinh bột mang ampicillin (S100+Amp) cho hiệu quả kháng khuẩn tương đương ampicillin. Điều này chứng tỏ cùng kích thước nano nhưng thế zeta âm của nano tinh bột đã làm cho nó không cải thiện hiệu quả kháng khuẩn, giá trị MIC/MBC tương đương ampicllin đơn thuần.

Bảng 3.5. Giá trị MIC và MBC của nanocomposite chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin với *E. coli*

Công thức	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBC/MIC
C100 + Amp	$3,27^{bc} \pm 0,12$	$6,33^{c} \pm 0,12$	1,93
C2S1 + Amp	$3,00^{a} \pm 0,00$	$5,07^{a} \pm 0,12$	1,67
C1S1 + Amp	$3,13^{ab} \pm 0,12$	$5,47^{b} \pm 0,12$	1,74
C1S2 + Amp	$3,33^{c} \pm 0,12$	$5,60^{b} \pm 0,00$	1,68
S100 + Amp	$4,27^{e} \pm 0,12$	$6,73^{d} \pm 0,12$	1,57
Amp	$4,00^{d} \pm 0,00$	$6,60^{d} \pm 0,00$	1,65



Hình 3.23. Giá trị MBC (µg/mL) ampicillin (trái) và C2S1+Amp (phải) với *E. coli.*

3.3. Nghiên cứu tạo vật liệu nanocomposite chitosan/cellulose và khả năng kháng khuẩn của nanocomposite chitosan/cellulosse mang kháng sinh ampicillin

3.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan và cellulose (CMC) đến tính chất của nanocomposite chitosan/cellulose bằng phương pháp sấy phun

Kết quả bảng 3.6 và Hình 3.25 cho thấy kích thước hạt nano, micro chitosan (C100) trung bình là 816 nm, và tăng dần khi tỷ lệ C giảm dần và tăng tỷ lệ M trong thành phần nano và microcomposite. Kích thước trung bình là 954 nm ở mẫu C5M1, tăng lên 1049 nm (C4M1), 1144 nm (C3M1) và 1288 nm (C2M1). Kích thước hạt micro

composite chitosan/cellulose sẽ tăng lên 1313 nm (C1M3) và đạt cực đại 1906 nm (C1M5).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan/cellulose đến tính chất của nanocomposite chitosan/cellulosse bằng phương pháp sấy phun

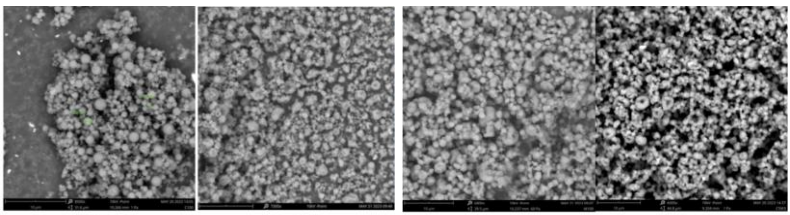
Mẫu	C/M (w/w)	Zeta potential (mV)	Kích thước hạt trung bình (nm)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hiệu suất hấp phụ Amp (%)
C100	1:0	67.67±0.92	816.9±24.5^{e}	75.49±0.35^{a}	68.6±1.2^{c}
C5M1	5:1	82.70±0.45	954.2±20.3^{e}	72.03±0.06^{b}	78.8±0.9^{b}
C4M1	4:1	85.07±1.81	1049.8±28.7^{d}	71.88±0.07^{b}	79.2±1.3^{b}
C3M1	3:1	89.53±1.89	1144.4±32.0^{d}	71.17±0.04^{b}	81.8±0.7^{a}
C2M1	2:1	90.37±1.05	1288.8±24.3^{c}	71.08±0.03^{b}	82.4±1.4^{a}
C1M1	1:1	78.63±1.02	1290.4±35.0^{c}	71.04±0.05^{b}	80.1±0.9^{b}
C1M2	1:2	61.67±2.45	1304.7±26.3^{c}	70.71±0.06^{c}	75.8±1.9^{c}
C1M3	1:3	-31.43±0.65	1313.0±18.2^{c}	69.15±0.03^{d}	58.6±0.7^{d}
C1M4	1:4	-39.17±0.05	1652.5±42.5^{b}	69.06±0.04^{d}	56.3±0.4^{d}
C1M5	1:5	-40.00±0.72	1906.8±40.4^{a}	68.72±0.60^{e}	50.8±0.8^{e}
M100	0:1	-81.73±0.90	1658.9±38.7^{b}	67.01±0.06^{e}	38.8±0.6^{f}

** ký tự a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt thống kê theo các giá trị trong cột với ($p<0.05$)*

Thế zeta của hạt nanocomposite

Kết quả ở trong Bảng 3.6 cho thấy điện thế zeta của các hạt nano chitosan (C100) thu được trong nghiên cứu là từ +67,67 mV.

Kết quả bảng 3.2, 3.6 và Hình 3.26 cũng cho thấy nếu tỷ lệ cellulose và tinh bột trong nano composite với chitosan phù hợp sẽ tạo ra thế zeta cao +70 mV đến +90 mV cao hơn so với nano chitosan đơn thuần

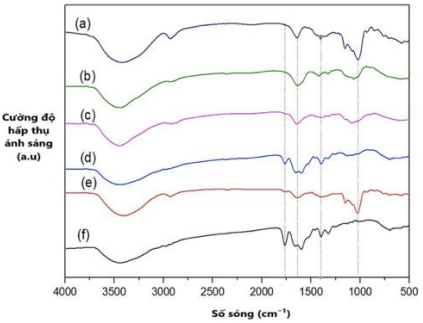


Hình 3.24. SEM của mẫu nano chitosan/cellulose composite và nano chitosan/cellulose composite hấp phụ Ampicilline.

Hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi nano và micro chitosan/cellulose trong nghiên cứu này biến thiên từ 67,01–75,49%. Trong đó các công thức composite giữa C:M cho hiệu suất từ 70-72% (Bảng 3.4). Hiệu suất này tương tự như nano composite giữa chitosan và tinh bột (C:S) 70-75% (Bảng 3.2).

FT-IR của nano microcomposite chitosan/cellulose



Hình 3.27. Phổ FT-IR của nano chitosan/cellulose composite và nano chitosan/cellulose composite hấp phụ kháng sinh ampicilline.

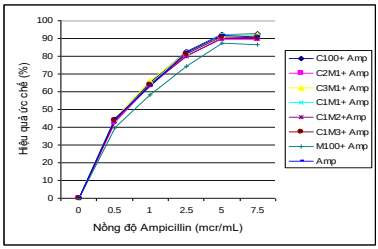
Trong đó: S100 (a); M100 (b); C100 (c); C2M1+Amp (d); C1S2+Amp (e) và Amp (f).

Phân tích FT-IR của ampicillin (Amp) được thể hiện trong Hình 3.27 (f) cho thấy đỉnh (peak) ở 3444 cm-1 có liên quan đến sự kéo dài N-H của amin bậc một và amid bậc hai của vòng beta-lactam và sự kéo dài O-H của nhóm cacboxylic có trong ampicillin.. Phổ FT-IR của Carboxymethyl cellulose (M100) trình bày trong Hình 3.27 (b) cho thấy các đỉnh ở 3450 cm-1 tương ứng sự kéo dài -OH, 2927 cm-1 tương ứng tín hiệu của -CH đối xứng; 1064 cm-1 tương ứng C-O-C của liên kết glycoside

Phổ FTIR của mẫu chitosan (C100) trong Hình 3.27 (c) chỉ ra rằng chitosan thể hiện các đỉnh đặc trưng cho dao động của các liên kết trong chitosan như sau: Đỉnh ở 3449 cm-1 là do sự kéo dài -OH và nhóm amin bậc I -NH2. Đỉnh ở 2930 cm-1 là điển hình cho dao động đối xứng C–H. Đỉnh ở 1641 cm-1 đặc trưng cho sự uốn cong N–H.

3.3.2. Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* của nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin

3.3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin bao gói trong nanocomposite chitosan/cellulose đến khả năng kháng khuẩn Staphyllococus aureus

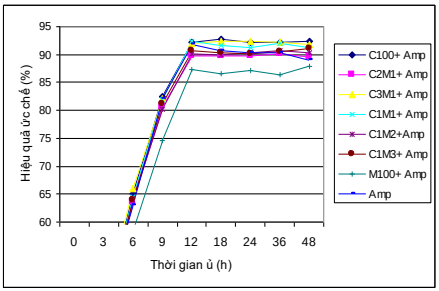


Hình 3.28. Ảnh hưởng nồng độ ampicillin đến kháng khuẩn *S. aureus*

Vì hiệu suất vi bao gói thấp nên hiệu quả ức chế của nano M100 + Amp chỉ đạt 87% so với ampicillin tự do là 92%. Các công thức C100 + Amp và C3M1 + Amp đạt tới 93,5% ở cùng nồng độ kháng sinh là 7,5µg/mL (Hình 3.28).

3.3.2.2. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn Staphylococcus aureus của nanocomposite chitosan/cellulose mang ampiciilin

Kết quả hình 3.29 cũng cho thấy ampicillin được bao gói trong nano composite chitosan/cellulose có hiệu quả kháng khuẩn *S. aureus* ổn định trong 48h, đặc biệt các mẫu C3M1 +Amp và C1M1+Amp. Các mẫu nano composite có cấu trúc nano ổn định, dạng mạng lưới do sự kết hợp giữa chitosan (polycation) với CMC (polyanion).



Hình 3.29. Ảnh hưởng nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin đến khả năng kháng khuẩn *S. aureus*

Bảng 3.7. Giá trị MIC và MBC của chitosan/cellulose nanocomposite mang kháng sinh ampicillin trên *S. aureus*

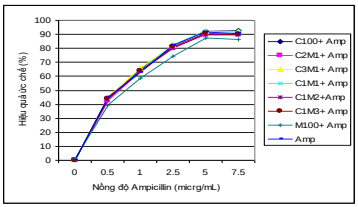
Công thức	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Tỷ lệ MBC/MIC
C100 + Amp	$3,53^{c} \pm 0,12$	$6,47^{c} \pm 0,12$	1,83
C2M1 + Amp	$3,20^{a} \pm 0,00$	$5,33^{a} \pm 0,12$	1,66
C1M1 + Amp	$3,30^{ab} \pm 0,12$	$5,73^{b} \pm 0,12$	1,70
C1M2 + Amp	$3,47^{c} \pm 0,12$	$5,80^{b} \pm 0,00$	1,67
M100 + Amp	$4,27^{e} \pm 0,12$	$7,07^{e} \pm 0,12$	1,65
Amp	$3,93^{d} \pm 0,12$	$6,80^{d} \pm 0,00$	1,73

Vật liệu nano, microcomposite chitosan/cellulose có hiệu quả bao gói cao hơn so với nanocomposite chitosan/tinh bột. Tỷ lệ C3M1 và C1M1 góp phần làm giảm chi phí, hoàn toàn không dùng hoá chất, dung môi và nanocomposite chitosan/cellulose hoàn toàn ổn định trong môi trường axit và kháng lại sự phân huỷ của amylase và enzyme tiêu hoá ở người. Tỷ số MBC/MIC các mẫu nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin (C2M1+Amp; C1M1+Amp và C1M2+Amp) từ 1,66-1,70 thấp hơn so với Ampicillin đơn thuần và nanochitosan mang ampicillin (C100+Amp) là 1,73-1,83. Điều này chứng tỏ nanocomposite chitosan/cellulose đã cải thiện hoạt tính kháng và tiêu diệt vi khuẩn *S. aureus* so với nano chitosan và ampicillin đơn thuần. Vì vậy, nanocomposite chitosan/cellulose là vật liệu tiềm năng, phù hợp để mang kháng sinh cho các nghiên cứu thử nghiệm sâu hơn.

3.3.3. Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn E. coli của nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin

3.3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin trong nanocomposite chitosan/cellulose đến khả năng kháng khuẩn Escherichia coli

Hình 3.30 cho thấy nồng độ Ampicillin 5 µg/mL bao gói trong nano chitosan/cellulose với các tỷ lệ khác nhau được sử dụng để đánh giá tính kháng lại tính kháng thuốc của E. coli và xác định được tỷ lệ chitosan và cellulose phù hợp mang lại hiệu quả ức chế tối ưu nhất.

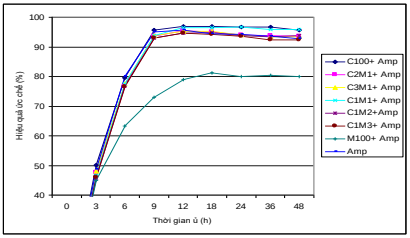


Hình 3.30. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin hấp phụ trên nano chitosan/cellulose composite đến khả năng kháng khuẩn *E. coli*

3.3.3.2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của nanocomposite chitosan/cellulose tải ampicillin với Escherichia coli

Nghiên cứu tiếp tục theo dõi hoạt tính kháng khuẩn đến 48h ủ để đánh giá tính kháng thuốc của *E. coli* và khả năng kháng lại tính kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* (Hình 3.31). Kết quả cho thấy hiệu quả kháng khuẩn tiếp tục kéo dài, duy trì ổn định sau 24, 36 và 48h. Trong khi đó, với mẫu ampicillin tự do cũng có xu hướng giảm từ 95,64% xuống 93,87%. Sự khác biệt về hiệu quả kháng khuẩn tại thời điểm 48h giữa các công thức là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Kết quả này cũng là minh chứng cho thấy chủng *E. coli* là chủng kháng thuốc và giải pháp vi bao kháng sinh ampicillin trong nano chitosan/cellulose composite là hiệu quả để kháng lại tính kháng thuốc của chủng vi khuẩn.



Hình 3.31. Ảnh hưởng nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin đến khả năng kháng khuẩn *E. coli*

Điều này cũng tương tự với các nghiên cứu công bố trên thế giới khi vi bao kháng sinh trong nano chitosan. Nano composite với tỷ lệ C1M1 và C2M1 là nanocomposite phù hợp để mang kháng sinh ampicillin kháng lại vi khuẩn *E. coli* gây bệnh.

3.3.3.3. MIC/MBC của nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin với Escherichia coli

Bảng 3.8. Giá trị MIC và MBC của nanocomposite chitosan/cellulose mang kháng sinh ampicillin trên *Escherichia coli*

STT	Công thức	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Tỷ lệ MBC/MIC
1	C100 + Amp	$3,25^{ab} \pm 0,12$	$6,40^{c} \pm 0,12$	1,96
2	C2M1 + Amp	$3,00^{a} \pm 0,12$	$5,20^{a} \pm 0,00$	1,73
3	C1M1 + Amp	$3,20^{ab} \pm 0,12$	$5,60^{b} \pm 0,12$	1,75
4	C1M2 + Amp	$3,40^{b} \pm 0,00$	$5,80^{b} \pm 0,00$	1,70
5	M100 + Amp	$4,40^{d} \pm 0,12$	$7,20^{e} \pm 0,12$	1,63
6	Amp	$4,00^{c} \pm 0,00$	$6,60^{d} \pm 0,00$	1,65

Kết quả Bảng 3.8 cũng cho thấy giá trị MIC/MBC của nanocomposite chitosan/cellulose mang ampicillin với đối tượng *E. coli* tương tự như *S. aureus* (3.3.2), giá trị biến thiên từ 3,0-3,4 µg/mL và 5,20-5,80 µg/mL. Giá trị này thấp hơn ampicillin đơn thuần hoặc ampicillin được bao gói trong hạt nano chitosan (C100+Amp).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Chitosan có khối lượng phân tử 350-500 kDa là vật liệu phù hợp để tạo nano chitosan và mang kháng sinh amoxicillin để kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Hạt nano chitosan được tạo bằng phương pháp gel ion với TPP kết hợp với sấy phun có kích thước trung bình 300 nm, thế zeta +54 mV, giá trị MIC của nano chitosan kháng *S. pneumoniae* là 60-80 µg/mL. Khi kết hợp với kháng sinh amoxicillin, nano chitosan đã tăng cường khả năng kháng khuẩn kháng thuốc *S. pneumoniae*, giá trị MIC của nano chitosan/amoxicillin là 1µg/mL, thấp hơn 2 µg/mL so với chỉ sử dụng amoxicillin tự do in vitro.

Đã tạo được nanocomposite chitosan/tinh bột tạo bằng phương pháp sấy phun để mang kháng sinh ampicillin. Hạt nanocomposite có dạng hình cầu, đồng nhất và cấu trúc ổn định, có cấu trúc mạng lưới nhờ hình thành các liên kết hydro, kích thước hạt trung bình từ 300-500 nm. Tỷ lệ thích hợp để tạo nanocomposite giữa chitosan và tinh bột là 1:1 (C1S1) hoặc 1:2 (C1S2), thế zeta cao từ +71 mV đến +80 mV. Hiệu suất mang kháng sinh ampicillin của nanocomposite chitosan/tinh bột từ 70-77% cao hơn so với nanochitosan và nano tinh bột. Hạt nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampiciline thể hiện hoạt tính kháng và diệt khuẩn *E. coli* và *S. aureus* cao hơn và ổn định hơn so với ampicillin tự do hoặc khi được bao gói trong nanochitosan. MIC của nano composite chitosan/tinh bột (C1S1+Amp và C1S2+Amp) từ 3,0-3,2 µg/mL và MBC biến thiên 5,2-5,8 µg/mL. Nanocomposite chitosan/tinh bột mang ampicillin bằng phương pháp sấy phun là vật liệu mang và dẫn truyền kháng sinh hiệu quả in vitro.

Đã tạo được Nanocomposite chitosan/cellulose tạo bằng phương pháp kết hợp gel ion giữa hai polymer chitosan và CM-Cellulose có điện tích trái dấu kết hợp với sấy phun là phương pháp đơn giản và hiệu quả. Hạt nanocomposite chitosan/cellulose có dạng hình cầu đều, bề mặt ổn định, có cấu trúc mạng lưới, kích thước hạt trung bình từ 1200-1300 nm, thế zeta biến thiên từ +70 mV đến +90 mV, hiệu suất thu hồi đạt > 70%. Tỷ lệ chitosan và cellulose thích hợp tạo nanocomposite là 2:1 (C2M1) và 1:1 C1M1). Hiệu suất vi bao kháng sinh ampicillin (LE%) từ 75,8-82,1%. Tỷ lệ chitosan và cellulose thích hợp để tạo nanocomposite là C2M1 và C1M1. MIC/MBC với *S. aureus* và *E. coli* biến thiên từ 3,0-3,2 µg/mL và 5,2-5,6 µg/mL, tỷ lệ

MBC/MIC là 1,72. Nano composites chitosan/cellulose là vật liệu tiềm năng, hiệu quả để mang và dẫn truyền thuốc kháng sinh ampicillin để kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* và *E. coli* in vitro.

Kiến nghị

Phương pháp tạo nanocomposite giữa chitosan với tinh bột hoặc cellulose có nhiều ưu điểm và có tiềm năng ứng dụng cao trong việc nâng cao hiệu quả kháng sinh chống lại vi khuẩn gây bệnh trên người và vi khuẩn kháng thuốc. Đề nghị tiếp tục nghiên cứu sâu hơn tạo hạt nanocomposite mang kháng sinh để nâng cao hiệu quả của các loại thuốc kháng sinh.

Nghiên cứu xây dựng các mô hình thử nghiệm hiệu quả của nanocomposite chitosan với tinh bột và cellulose mang kháng sinh trên tế bào, động vật thí nghiệm và thử nghiệm lâm sàng trên người để có thể phát triển các sản phẩm thuốc điều trị hiệu quả các loại bệnh ở người và vật nuôi do vi khuẩn gây ra.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyễn Vĩnh Nghi, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Anh Dũng (2022). Ảnh hưởng của khối lượng phân tử của chitosan đến khả năng kháng khuẩn *Streptococcus pneumoniae* của phức hợp nano chitosan/amoxicillin tạo bằng phương pháp gel ion và sấy phun. Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2022, 12/2022; Buôn Ma Thuột, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, trang 535-542.

2. Vinh Nghi Nguyen, Van Bon Nguyen, Minh Dinh Tran, Manh Dung Doan, Dinh Sy Nguyen, Thi Huyen Nguyen, Chien Thang Doan, Thi Ngoc Tran, San Lang Wang, and Anh Dzung Nguyen* (2024). Enhancing the antibacterial activity of ampicillin loaded into chitosan/starch nanocomposites against AMR *Staphylococcus aureus*, *Carbohydrate Research*, Elsevier; (545)109274 (**Q2)**

3.Vinh Nghi Nguyen, San-Lang Wang, Thi Huyen Nguyen, Van Bon Nguyen, Manh Dung Doan, and Anh Dzung Nguyen*(2024). Preparation and Characterization of Chitosan/Starch Nanocomposite Loaded Ampicillin to Enhance Anti-Bacterial Activity against *Escherichia coli*; *Polymers*, MDPI, 16, 2647. (**Q1)**

4.Nguyễn Vĩnh Nghi, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Anh Dũng (2024). Nâng cao hoạt tính kháng khuẩn *Escherichia coli* bằng phức hợp nano chitosan/tinh bột mang ampicillin. Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ Sinh học 2024, 09/2024; Thành phố Huế , NXB Đại học Huế, trang 326-331.