

ĐẶC TÍNH LÝ HÓA VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* CỦA HẠT NANOCHITOSAN TỪ CHITOSAN RUỒI LÍNH ĐEN

Nguyễn Ngọc Hà^{1,2}, Vũ Thị Huyền Trang², Thái Thị Thanh Thùy¹,
Nguyễn Thị Thùy Dung¹, Nguyễn Phúc Cẩm Tú^{3*}

¹Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

³Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành để tối ưu các điều kiện ảnh hưởng đến quy trình tạo hạt nano chitosan (nanoCS) từ chitosan của nhộng ruồi lính đen bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Đồng thời, đánh giá các đặc tính lý hóa và kháng khuẩn của hạt nanoCS đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi. Kết quả của nghiên cứu đã đưa ra được các điều kiện tối ưu tạo hạt nanoCS theo phương pháp tạo gel ion giữa CS và TPP bao gồm nồng độ CS 0,625 mg/mL; nồng độ TPP là 0,3 mg/mL; pH 4 và tốc độ khuấy 500 rpm. Các hạt nanoCS có kích thước trung bình là 179,11 nm. Hình dáng hạt nanoCS có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều. Hạt nanoCS không thể hiện tính kháng đối với vi khuẩn *S. agalactiae*, điều này có lẽ liên quan đến tính ổn định của hạt trong dung dịch.

Từ khóa: Chitosan, hạt nano chitosan, phương pháp bề mặt đáp ứng, phương pháp tạo gel, ruồi lính đen.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, các nhà khoa học trên thế giới đang có xu hướng nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên và từ đó cải biến để tạo ra các chất mới có hoạt tính được nâng cao, trong đó có chitosan (CS). CS là một hợp chất deacetyl hóa từ chitin, một polymer tự nhiên được tạo thành từ các đơn phân N-acetyl glucosamine, hiện diện trong vỏ của các loài giáp xác, côn trùng và trong vách của tế bào nấm. CS có nhiều ứng dụng do đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, kháng oxy hóa, giảm cholesterol, giảm huyết áp. CS có nguồn gốc tự nhiên và không gây độc hại, ngày càng được ưa chuộng và ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, công nghiệp giấy, mỹ phẩm, lĩnh vực nông nghiệp, lĩnh vực xử lý nước thải,...(Triunfo *et al.*, 2022). Ấu trùng ruồi lính đen (RLĐ), *Hermetia illucens*, được ứng dụng trong việc xử lý chất thải hữu cơ, sản xuất các sản phẩm có giá trị cao như protein, dầu, phân bón hữu cơ. Trong những năm gần đây, việc nuôi ruồi lính đen nhận được sự quan tâm và mở rộng của các doanh nghiệp và hộ gia đình. Vỏ là vật liệu được thải ra trong quá trình sản xuất ấu trùng RLĐ và được xem là nguồn vật liệu rất phù hợp để sản xuất ra CS.

Để tăng cường và mở rộng hơn nữa tiềm năng ứng dụng của CS trong công nghệ sinh học và hóa học, công nghệ chế tạo hạt nanochitosan (nanoCS) đang là hướng nghiên cứu được nhiều nhóm nghiên cứu quan tâm. Do có kích thước siêu nhỏ nên hạt nanochitosan dễ dàng đi qua màng tế bào, ảnh hưởng đến các quá trình sinh hóa của vi sinh vật và ức chế khả năng phát triển của vi sinh vật. Trong những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy vai trò đặc biệt quan trọng của vật liệu hạt nanoCS trong lĩnh vực y dược và nông nghiệp như sử dụng làm chất mang, giải phóng thuốc có kiểm soát và nâng cao tính ổn định của thuốc (Chauhan *et al.*, 2017), (González-Reza *et al.*, 2021). Ngoài ra, các hạt nanoCS có kích thước nano còn được ứng dụng trong liệu pháp gen (Gaspar *et al.*, 2011). Trong lĩnh vực nông nghiệp, nanoCS đã được sử dụng làm chất bao gói cho các hợp chất thực vật có hoạt tính sinh học và hóa chất nông nghiệp bằng các công nghệ khác nhau, chẳng hạn như sấy phun và nhũ tương nano, để tăng cường hoạt độ kháng khuẩn (Mujtaba *et al.*, 2020). Hạt nanoCS trên vật liệu cơ bản là CS có thể chế tạo bằng phương pháp tạo gel ion với tác nhân tạo liên kết ngang là sodium tripolyphosphate (TPP). So với những chất tạo liên kết ngang hóa học khác như glutaraldehyde, glyoxal, 2,2-dimethoxy phenylacetophenone,... TPP là chất không có độc tính; ngoài ra nó còn là một muối dễ tan, kích thước nhỏ.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định các điều kiện tối ưu để chế tạo hạt nanoCS từ CS của vỏ nhộng RLĐ và đánh giá các tính chất lý hóa và hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 11 năm 2023 tại Viện Nghiên cứu Công Nghệ Sinh học và Môi trường (RIBE), Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh (NLU). Vỏ nhộng RLĐ được thu nhận từ khu

thực nghiệm Black Soldier Fly Project RIBE - CJ KOREA, RIBE. CS được tổng hợp theo phương pháp hóa học theo quy trình của RIBE. Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy Sản, Khoa Thủy Sản, NLU.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các điều kiện tối ưu tạo hạt kích thước nano

Phương pháp phối hợp có tâm (*central composite design* - CCD) được lựa chọn để ước tính tác động của các yếu tố đầu vào đối với hàm mục tiêu và đánh giá kết quả thực nghiệm. Bốn yếu tố được lựa chọn là nồng độ CS (X_1 , 0,35–0,9 mg/mL), nồng độ TPP (X_2 , 0,3–0,8 mg/mL), pH (X_3 , 4–6) và tốc độ khuấy (X_4 , 500–1500 rpm) với hàm mục tiêu là kích thước hạt nanoCS (nm) nhỏ nhất bằng cách sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng, mỗi yếu tố tiến hành tại 3 mức (-1, 0, +1). Số thí nghiệm được thực hiện là $N = 2k(k - 1) + C_0$ ($N = 29$, $k = 4$) gồm 24 thí nghiệm thừa số và 5 thí nghiệm ở tâm được trình bày cụ thể tại Bảng 1. Hàm mục tiêu là kích thước hạt nanoCS (nm), kích thước càng nhỏ càng tốt.

Tổng hợp hạt nano chitosan bằng phương pháp tạo gel ion

Các hạt nanoCS được điều chế theo phương pháp tạo gel ion (Tang *et al.*, 2006). CS được hòa tan trong dung dịch acid acetic 2,0% (v/v). Sau đó, 20 mL dung dịch TPP được nhỏ giọt từ từ vào 40 mL dung dịch CS đã điều chỉnh pH trong khoảng thực nghiệm và tiến hành khuấy theo các tốc độ trong Bảng 1. Dung dịch xuất hiện huyền phù màu trắng đục.

Bảng 1. Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả kích thước hạt nanoCS

Nghiệm thức	Nồng độ CS (X_1 , mg/mL)	Nồng độ TPP (X_2 , mg/mL)	pH (X_3)	Tốc độ khuấy (X_4 , rpm)	Kích thước hạt (nm)
1	0,625	0,55	6	1500	354,8
2	0,900	0,55	4	1000	190,6
3	0,625	0,55	6	500	556,6
4	0,900	0,30	5	1000	243,9
5	0,900	0,55	6	1000	472,2
6	0,625	0,55	5	1000	448
7	0,625	0,80	5	500	-
8	0,625	0,30	5	500	242,3
9	0,625	0,80	6	1000	-
10	0,900	0,55	5	500	207,6
11	0,625	0,30	5	1500	174,7
12	0,350	0,55	5	500	-
13	0,350	0,55	4	1000	-
14	0,350	0,55	6	1000	-
15	0,625	0,55	5	1000	343,7
16	0,350	0,55	5	1500	-
17	0,625	0,55	4	500	172,8
18	0,625	0,55	5	1000	413,7
19	0,625	0,80	4	1000	-
20	0,625	0,80	5	1500	-
21	0,350	0,30	5	1000	208
22	0,900	0,80	5	1000	1013,7
23	0,625	0,30	4	1000	-
24	0,625	0,55	4	1500	702,5

CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

25	0,625	0,55	5	1000	325,9
26	0,350	0,80	5	1000	-
27	0,900	0,55	5	1500	229,3
28	0,625	0,55	5	1000	474,3
29	0,625	0,30	6	1000	483,4

- kích thước vượt quá dài đo kích cỡ hạt của máy (> 10 μ m).

Đặc tính lý hóa của hạt nano chitosan

Xác định hình dáng hạt nanoCS bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét FESEM Hitachi SU – 8010 tại Viện Công nghệ Nano, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. Đường kính hạt và độ phân tán của hạt được đo bằng máy phân tích kích thước hạt DLS Horiba SZ – 100V2 tại Trung tâm Phân tích Quốc tế, Trường Đại học Công Thương TP. Hồ Chí Minh.

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch. Cây trang vi khuẩn *S. agalactiae* trên bề mặt môi trường thạch TSA (350 μ L dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^5 (gần bằng 5×10^6 CFU/mL), sau đó đĩa thạch được để khô 15 phút. Tiến hành đục các lỗ đường kính 6 mm, sử dụng 40 μ L dịch thử cho mỗi lỗ. Đối chứng dương được sử dụng là Penicillin, đối chứng âm là acid acetic 2%. Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm ở 35 - 37°C. Đọc kết quả sau 24 giờ. Mẫu thử có tác động kháng khuẩn cho vòng ức chế xung quanh giếng chứa mẫu thử. Kích thước vòng kháng khuẩn = D – 6 (D là đường kính vòng kháng khuẩn, đơn vị mm). Dưa vào đường kính vòng vi khuẩn để xác định khả năng kháng khuẩn của các dung dịch (Faikoh *et al.*, 2014).

Xử lý số liệu

Phần mềm Design Expert (Version 11.0.4.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) được dùng để xử lý các số liệu thực nghiệm và phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật toán hàm mong đợi. Phân tích phương sai ANOVA một yếu tố được sử dụng để so sánh sự khác nhau về đường kính vòng kháng khuẩn với phép thử LSD là kiểm định so sánh đối chiếu. Mức ý nghĩa $\alpha \leq 0,05$. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu hóa các điều kiện chế tạo nano chitosan

Sau khi tiến hành các thí nghiệm, kích thước hạt của hạt nanoCS được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả cho thấy kích thước hạt dao động trong khoảng 172,8 nm đến 1013,7 nm.

Ảnh hưởng của bốn yếu tố là nồng độ CS (X_1), nồng độ TPP (X_2), pH (X_3) và tốc độ khuấy (X_4) cũng như sự tương tác giữa các yếu tố đến hàm mục tiêu (kích thước hạt nanoCS) được tiến hành xây dựng bởi hàm hồi quy bậc 2 cho hàm mục tiêu (Y) như sau:

$$Y = 401,12 - 132,73X_1 + 535,58X_2 + 9,03X_3 + 81,98X_4 - 150,67X_1X_2 + 131,78X_1X_3 - 71,13X_1X_4 - 152,92X_2X_3 + 115,78X_2X_4 - 182,88X_3X_4 - 16,25X_1^2 + 376,65X_2^2 + 79,25X_3^2 - 33,70X_4^2$$

Bảng 2. Kết quả phân tích ANOVA ảnh hưởng của các yếu tố đến kích thước hạt

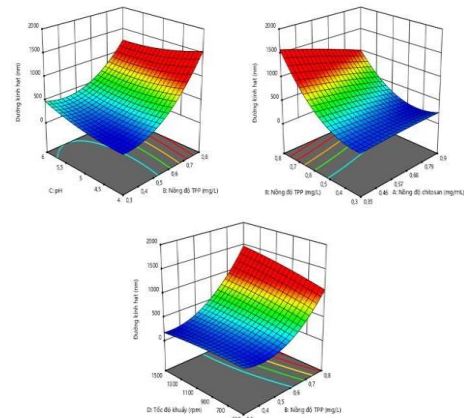
Yếu tố	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	F-value	p-value	Ghi chú
Mô hình	7.99E+08	14	57086,02	13,70	0,0108	Có ý nghĩa
X_1 -Nồng độ CS	10066,24	1	10066,24	2,42	0,1951	
X_2 -Nồng độ TPP	1.64E+08	1	1.64E+08	39,34	0,0033	
X_3 -pH	325,80	1	325,80	0,0782	0,7936	
X_4 -Tốc độ khuấy	26879,60	1	26879,60	6,45	0,0640	
X_1X_2	10090,20	1	10090,20	2,42	0,1947	
X_1X_3	23152,87	1	23152,87	5,56	0,0779	
X_1X_4	6745,02	1	6745,02	1,62	0,2722	
X_2X_3	8504,02	1	8504,02	2,04	0,2263	
X_2X_4	17871,80	1	17871,80	4,29	0,1071	

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

X_3X_4	1.34E+08	1	1.34E+08	32,11	0,0048
X_1^2	193,75	1	193,75	0,0465	0,8398
X_2^2	1.65E+08	1	1.65E+08	39,48	0,0033
X_3^2	17326,78	1	17326,78	4,16	0,1110
X_4^2	3132,47	1	3132,47	0,7518	0,4348
Sai số thuần	16666,41	4	4166,60		
Tổng tương quan	8.16E+08	18			
R^2				0,9796	
R^2 hiệu chỉnh				0,9081	
Độ chính xác phù hợp (Adeq Precision)				14,6617	

Giá trị F của mô hình là 13,7 với $p = 0,0108$ ($p < 0,05$) (Bảng 2) cho thấy các hệ số hồi quy có nghĩa. Mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 95% và Adeq Precision là 14,662 lớn hơn so với 4, cho thấy mô hình đủ độ chính xác. Các giá trị $p < 0,05$ cho thấy các biến riêng lẻ hoặc tương tác của mô hình có ý nghĩa. Do đó, X_2 , X_3X_4 và X_2^2 là các biến có ý nghĩa và có ảnh hưởng nhiều hơn những biến còn lại.

Hệ số của X_1 , X_1X_2 , X_1X_4 , X_2X_3 và X_3X_4 của phương trình hồi quy mang dấu (-) nói lên mối quan hệ nghịch biến giữa các biến và hàm mục tiêu Y. Đồng thời các hệ số của X_2 , X_3 và X_4 mang dấu (+) cho thấy trong vùng quy hoạch, hàm mục tiêu Y tỷ lệ thuận với các yếu tố nồng độ TPP, pH dung dịch và tốc độ khuấy. Một số nghiên cứu cũng ghi nhận kết quả kích thước hạt nanoCS nhỏ hơn ở pH thấp (Mattu *et al.*, 2013; Gokce *et al.*, 2014) vì chuỗi chitosan được kéo dài hơn ở độ pH thấp hơn do sự proton hóa của các nhóm amino. Nếu giữ cố định tỷ lệ khối lượng CS/TPP = 4:1, Liu và Gao (2009) nhận thấy khi tăng nồng độ CS thì kích thước hạt tăng; trái lại tăng nồng độ TPP thì kích thước hạt lại giảm. Tương tự, theo Gokce và đồng tác giả (2014) tỷ lệ khối lượng CS/TPP có ảnh hưởng quan trọng lên kích thước hạt nanoCS. Hạt nanoCS có thể thu nhận được ở tất cả tỷ lệ CS/TPP từ 3:1 đến 7:1, nhưng các hạt mịn nhất là ở tỷ lệ 5:1. Điều này là hợp lý vì trong phản ứng tạo gel ion TPP là thành phần chính tạo liên kết ngang. Ở nồng độ TPP cao hơn thì mức độ liên kết ngang của các hạt nanoCS cũng cao hơn.



Hình 1. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của bốn yếu tố nồng độ chitosan (X_1), nồng độ TPP (X_2), pH (X_3) và tốc độ khuấy (X_4) đến kích thước hạt nano chitosan

Kiểm định giá trị tối ưu và thực nghiệm

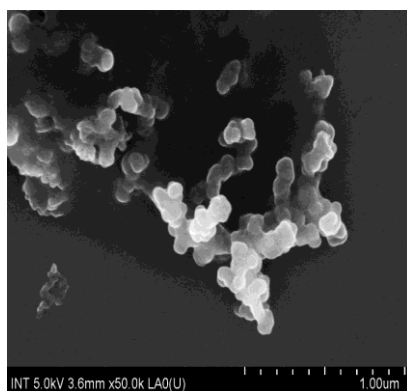
Dựa vào kết quả phân tích thống kê, mô hình đã đưa ra được điều kiện tối ưu để tạo ra kích thước hạt nanoCS nhỏ nhất (196,32 – 188,90 nm) là ở nồng độ CS = 0,625 mg/mL, nồng độ TPP = 0,55 mg/mL, pH = 4 và ở tốc độ khuấy 500 rpm. Để kiểm chứng lại tính đúng đắn của mô hình, tiến hành thí nghiệm thực nghiệm với 10 lần lặp lại. Kích thước hạt nanoCS trung bình thu được là 180,17 ± 5,52 nm, dao động trong khoảng 173,08 – 188,18 nm (Bảng 3). Kiểm định bằng *t* hai mẫu độc lập cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các giá trị tối ưu từ mô hình và thực nghiệm ($p > 0,05$). Do đó điều kiện tối ưu cho quá trình tạo hạt nanoCS là ở nồng độ CS = 0,625 mg/mL, nồng độ TPP = 0,55 mg/mL, pH = 4 và tốc độ khuấy 500 rpm cho ra hạt có kích thước trung bình đạt 180,17 ± 5,52 nm.

Bảng 3. Bảng đánh giá khác biệt ý nghĩa của thực nghiệm

Điều kiện	Nồng độ CS (mg/ml)	Nồng độ TPP (mg/ml)	pH	Tốc độ khuấy (rpm)	Kích thước hạt (nm)
Mô hình	0,625	0,55	4	500	196,32 - 188,90
Thực nghiệm	0,625	0,55	4	500	173,08 – 188,18

Đặc điểm lý hóa của hạt nano chitosan

Hình thái của hạt nanoCS được kiểm tra bằng FE-SEM. Các hạt nanoCS có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều (Hình 2). Các hạt tròn kích thước nhỏ tập hợp lại thành các khối kích thước lớn hơn phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Calvo *et al.*, 1997; Liu, Gao, 2009). Hình dạng hình cầu là mong muốn của thí nghiệm vì hình cầu giúp đảm bảo sự đóng gói kín của hạt nanoCS.



Hình 2. Hình chụp FESEM của hạt nano chitosan ở độ phóng đại 50.0k

Bảng 4. Kết quả kích thước và phân bố hạt

Kích thước hạt (nm)	Phân bố (%)
93,02	0,51
105,1	3,35
118,74	9,70
134,16	15,58
151,57	18,74
171,25	18,72
193,48	15,90
218,6	11,10
246,98	5,56

Bảng 4 cho thấy kích thước hạt nanoCS trung bình là 171,8 nm và hạt chủ yếu phân bố ở hai kích thước là 151,57 và 171,25 nm. Giá trị PI (Polydispersity Index) là 0,388 cho thấy mẫu có sự đồng nhất cao với kích thước hạt gần nhau.

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Bảng 5. Kết quả thí nghiệm đo vòng kháng khuẩn

Tác nhân	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Mức độ kháng
Đối chứng dương (+)	16,67 ^a ± 1,53	Kháng mạnh
Đối chứng âm (-)	7,33 ^c ± 1,53	Không kháng
Chitosan từ RLD	11,00 ^b ± 1,00	Kháng vừa
Chitosan của Sigma	11,00 ^b ± 1,00	Kháng vừa
Hạt nanoCS	7,00 ^c ± 1,73	Không kháng



Hình 3. Khả năng kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Đối chứng dương (+), đối chứng âm (-), Chitosan từ RLD (CS), Chitosan của Sigma (CSC), hạt nanoCS (NN).

Vòng kháng khuẩn của hạt nanoCS có kích thước 7 mm cho thấy hạt nanoCS không có khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae* (Bảng 5, Hình 3). Đối chứng dương cho vòng kháng khuẩn kích thước 16,7 mm thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh. CS từ RLD và CS của Sigma đều cho ra vòng kháng khuẩn kích thước 11 mm cho thấy CS có khả năng kháng khuẩn khá tốt (Bảng 5, Hình 3). Kết quả cho thấy hạt nanoCS không thể hiện tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae*.

Hoạt tính kháng khuẩn của nanoCS phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, bao gồm loại vi khuẩn, giai đoạn tăng trưởng, thế zeta (ảnh hưởng độ bền của hạt nanoCS trong dung dịch), nồng độ, pH, trọng lượng phân tử (MW) và độ khử nhóm acetyl (DA) (Chandrasekaran *et al.*, 2020). Hạt nanoCS có phổ kháng khuẩn rộng, nhưng chúng biểu hiện hiệu quả ức chế khác nhau đối với các loài vi khuẩn gram âm và gram dương và hiệu quả diệt khuẩn đối với hai loại vi khuẩn này còn gây tranh cãi. Lê Hồ Khánh Hỷ và đồng tác giả (2015) ghi nhận nanoCS ở các nồng độ từ 0,125 - 0,5 mg/mL đều không thể hiện tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Salmonella typhi*. Các tác giả này cho rằng kích thước hạt nanoCS nhỏ có thể ảnh hưởng đến độ bền dung dịch nanoCS do bị biến tính. Chattopadhyay và Inamdar, 2012 báo cáo nanoCS mất hoạt tính kháng khuẩn có thể liên quan đến tính ổn định của hạt nanoCS trong dung dịch. Ngoài ra, Sarwar và đồng tác giả (2014) báo cáo các hạt nanoCS tạo từ CS có MW thấp thể hiện tính kháng khuẩn tốt hơn từ CS có MW cao. Bên cạnh đó, cấu trúc và thành phần hóa học của màng tế bào cũng có ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS (Sarwar *et al.*, 2014).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đưa ra quy trình tạo hạt nanoCS từ CS rươi lính đen theo phương pháp tạo gel ion giữa CS và TPP với các điều kiện tối ưu là nồng độ CS = 0,625 mg/mL; nồng độ TPP = 0,3 mg/mL; pH = 4; tốc độ khuấy 500 rpm. Các hạt nanoCS có kích thước trung bình là 179,11 nm. Hình dáng hạt viên bao được xác định bằng phương pháp chụp FESEM cho thấy hạt có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều. Hạt nanoCS không thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae*. Cần có các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố như thế zeta, nồng độ nanoCS, pH, MW và DA lên hoạt tính kháng với các nhóm vi khuẩn khác nhau.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí thực hiện (Mã số đề tài: CS-CB22-VienCNSH-02).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, 63: 125-132.
- Chattopadhyay DP, Inamdar MS (2012). Studies on synthesis, characterization and viscosity behaviour of nano chitosan. *Res J Eng Sci*, 1: 9-15.
- Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: a review. *Processes* 8 (9):1173.
- Chauhan N, Dilbaghi N, Gopal M, Kumar R, Kim KH, Kumar S (2017). Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *Int J Biol Macromol*, 97: 616-624.
- Faikoh EN, Hong YH, Hu SY (2014). Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol*, 38: 15-24.
- Gaspar VM, Sousa F, Queiroz JA, Correia IJ (2011). Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, 22: 015101.
- Gokce Y, Cengiz B, Yildiz N, Calimli A, Aktas Z (2014). Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp*, 462: 75-81.
- González-Reza RM, Hernández-Sánchez H, Quintanar-Guerrero D, Alamilla-Beltrán L, Cruz-Narváez Y, Zambrano-Zaragoza ML (2021). Synthesis, controlled release, and stability on storage of chitosan-thyme essential oil nanocapsules for food applications. *Gels*, 7: 212.
- Lê Hồ Khánh Hỷ, Nguyễn Thu Hồng, Phan Bảo Vy, Đặng Quốc Minh, Đoàn Thị Thiết, Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ (2015). Một số đặc tính của nanochitosan có kích thước nhỏ được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel ion. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, Tập 37: 8-15.
- Liu H, Gao C (2009). Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym Adv Technol*, 20: 613-619.
- Mattu C, Li R, Ciardelli G, (2013). Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. *Polym Compos*, 34: 1538-1545.
- Mujtaba M, Khawar KM, Camara MC, Carvalho LB, Fraceto LF, Morsi RE, Elsabee MZ, Kaya M, Labidi J, Ullah H, Wang D (2020). Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. *Int J Biol Macromol*, 154: 683-697.
- Sarwar A, Katas H, Zin NM (2014). Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *J Nanoparticle Res* 16: 2517.
- Tang ZX, Qian JQ, Shi LE (2006). Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Appl Biochem Biotechnol*, 136: 77-96.
- Triunfo M, Tafi E, Guarnieri A, Salvia R, Scieuzo C, Hahn T, Zibek S, Gagliardini A, Panariello L, Coltelli MB, De Bonis A, Falabella P (2022). Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process. *Scientific Reports*, 12: 6613.

PHYSICOCHEMICAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CHITOSAN NANOPARTICLES FROM CHITOSAN OF BLACK SOLDIER FLY AGAINST *Streptococcus agalactiae*

Nguyen Ngoc Ha^{1,2}, Vu Thi Huyen Trang², Thai Thi Thanh Thuy¹,
Nguyen Thi Thuy Dung¹, Nguyen Phuc Cam Tu^{3*}

¹Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

Using the response surface methodology, this study optimized the conditions of chitosan nanoparticle (CSNP) production from chitosan (CS) of black soldier fly larvae. The obtained CSNPs were characterized by the physicochemical and antibacterial properties against *Streptococcus agalactiae* bacteria causing disease in tilapia. Optima conditions for CSNP production using an ionic gelation process with TPP were established at a CS concentration of 0.625 mg/mL, TPP concentration of 0.3 mg/mL, pH 4, and stirring speed of 500 rpm. The average size of the CSNP was 179.11 nm. The shape of the CSNP showed a spherical shape with a relatively uniform size. The CSNPs did not show resistance to *S. agalactiae*, which is probably related to the stability of the nanoparticles in the solution.

Keywords: Black soldier fly, chitosan, chitosan nanoparticles, ionic gelation process, response surface methodology.

* Author for correspondence: Tel: 949881001; Email: npctu@hcmuaf.edu.vn