NGHIÊN CỨU KHẢ NẰNG KHÁNG KHUẨN CỦA CACBOXYMETYL CHITOSAN TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIA NHIỆT VI SÓNG

Nguyễn Khánh Hoàng[1], Nguyễn Văn Cường[2,*] Hứa Thạch Sơn[1]
[1] Viện Công Nghệ Sinh Học và Thực Phẩm, Trường Đại Học Công Nghiệp Tp Hồ Chí Minh
[2] Khoa Công Nghệ Hóa Học, Trường Đại Học Công Nghiệp Tp Hồ Chí Minh, Khoa Kỹ Thuật Y Sinh, Trường Đại Học Chung Yuan, Đài Loan
08.8940390 Ext 666, Email: nvc2505@gmail.com

TÓM TẮT

Cacboxymetyl chitosan (CMC) đã được tổng hợp thành công trong nghiên cứu này và có khả năng thể hiện tính kháng khuẩn cao. Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá in vitro kháng khuẩn của CMC. Tính khảng khuẩn của CMC lên 4 chủng vi khuẩn Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Candida albicans và Saccaromyces.spp đã được đánh giá bằng cách tính toán MIC. Kết quả thí nghiệm cho thấy CMC có thể ngăn cản sự phát triển của các loại vi khuẩn được thử nghiệm. Giá trị MIC được tìm thấy ít hơn 20 ppm cho S.aureus và Saccharomyces sp, Bacillus 340 ppm cho cereus, và 180 ppm cho Candida albicans.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitosan là một copolymer gồm các mắt xích N-acetyl-D-glucosamin và D-glucosamnin liên kết với nhau bằng các liên kết β –1,4 glucoside. Cấu tạo của chitosan có từ 70 - 90% nhóm amino (-NH_2) ở vị trí C_2 của mạch, nên phạm vi hoạt động hóa học của chitosan lớn hơn nhiều so với chitin (chitin chỉ có khoảng dưới 10% nhóm amino) [1]. Chitosan, hợp chất được điều chế từ nguồn thiên nhiên là vỏ tôm cua, đã được nghiên cứu sử dụng trong lĩnh vực y dược như đã được ghi nhận có tính bảo vệ niêm mạc và gần đây trong lĩnh vực kỹ thuật y sinh bao gồm tái tạo da, xương và mạch máu [1]. Đặc biệt, chitosan đã được nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn, dùng trong bảo quản thực phẩm [1]. Chitosan có trong thành phần của nước giải khát, kem, sữa,..dùng làm chất ổn định thực phẩm, chống cholesterol [1]. Các màng mỏng chitosan được dùng để bao gói, bảo quản thực phẩm tươi sống, đông lạnh do khống chế được độ ẩm và độ thoáng khí cho thực phẩm, đồng thời làm chậm quá trình bị thâm của rau quả [1]. Ngoài ra, màng mỏng chitosan còn dễ phân hủy sinh học và thân thiện với môi trường hơn. [2,3] Tuy nhiên, chitosan chỉ tan trong dung dịch acid loãng, rất khó tan trong môi trường có pH trung tính nên ứng dụng của nó có phần bị hạn chế. Do vậy thực hiện tổng hợp cacboxymetyl chitosan nhằm tạo ra một dẫn xuất chitosan có độ hòa tan cao hơn, mở rộng ứng dụng của nó, tăng tính "an toàn" cho người sử dụng, nhất là trong lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Để đóng góp vào ứng dụng của chitoan trong công trình nghiên cứu trước đây chúng tôi tiến hành tổng hợp dẫn xuất cacboxymetyl chitosan bằng phương pháp gia nhiệt vi sóng, một phương pháp thân thiện với môi trường đồng thời nghiên cứu khả năng hấp thụ kim loại của các dẫn xuất chitosan tổng hợp ra. Tiếp tục công trình trên trong phạm vi của bài nghiên cứu này chúng tôi tiến

hành thử tác dụng khảng khuẩn của cacboxymetyl chitosan trên 2 chủng vi khuẩn *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus,* và 2 chủng nấm men *Saccharomyces.spp; Candida albicans*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm hóa học: chitosan có độ deacetyl hóa 80%, được mua từ Đại học Thủy Sản Nha Trang, Khánh Hòa. monocloroacetic axit có độ tinh khiết 99%, xuất xứ từ Merck. Các hóa chất khác: NaOH, HCl, CH_3OH, CH_3COOH, CH_3COONa có độ tinh khiết hóa học. Lò vi sóng HITOSHI ở chế độ Defrost. Phổ hồng ngoại IR được ghi trên máy TENSOR 37 với kỹ thuật viên nén KBr (dãy phổ từ 4000 – 500 cm^{-1}) sau khi mẫu đã được sấy khô ở 50^0C (độ ẩm sản phẩm từ 0.8 –3.0%).

Thí nghiệm vi sinh: *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Candida albicans* và *Saccaromyces.spp* được cung cung cấp bởi viện Pasteur Tp.HCM. Môi trường peptone agar bao gồm: pepton 10 g, agar 15 g và NaCl 5 g được hóa tan trong 1000 mL nước cất và điều chỉnh về pH 7. Môi trường sau chuẩn bị được đem hấp khử trùng ở 121^0C thời gian 20 phút trong nồi hấp và bảo quản ở nhiệt độ 4-8 ^0C. Cacboxymetyl chitosan (từ đây được viết tắt là CMC) nồng độ 1000 ppm trong môi trường được phân thành các dung dịch có nồng độ khác nhau: 0, 100, 200, 300, 400 và 500 ppm trong môi trường peptone lỏng. Môi trường pepton lỏng gồm pepton 10 g, NaCl 5 g được pha trong 1000 mL nước cất, pH điều chỉnh về 7.

2.2. Phương pháp tổng hợp cacboxymetyl chitosan

Cho vào bình nón 2.0 g chitosan cùng với 40 mL dung dịch NaOH 20% (w/v), khuấy trộn trên máy khuấy từ trong 15 phút để trương và kiềm hóa chitosan. Cho từ từ 2.0 g $ClCH_2COOH$ (chitosan: $ClCH_2COOH$ (1:1)) vào trong hỗn hợp trên và tiếp tục khuấy cho tan hết (khoảng 5 phút). Tiến hành gia nhiệt trong lò vi sóng với các thời gian gia nhiệt 60 giây và khống chế nhiệt độ phản ứng từ 60–70^0C. Hỗn hợp được trung hòa với HCl đậm đặc về pH 5.0–6.0 lọc và rửa sản phẩm với CH_3OH 70% để loại tạp chất vô cơ.

2.3. Phương pháp thử nghiệm tác dụng kháng khuẩn

Để khảo sát khả năng kháng khuẩn của dẫn xuất CMC chúng tôi sử dụng phương pháp đo quang ở bước sóng 580 nm (Máy đo quang hiệu Genesys, model: Genesys 100V, Mỹ) kết hợp với phương pháp đổ đĩa nhằm xác định mật độ vi sinh vật trong môi trường khảo sát. Ở những môi trường không có sự phát triển của vi sinh vật cho biết nồng độ tối thiểu tác động của chất khảo sát đến vi sinh vật (MIC). Đường cong chuẩn của từng giống vi sinh vật với các nồng độ khác nhau được thiết lập được thiết lập.Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

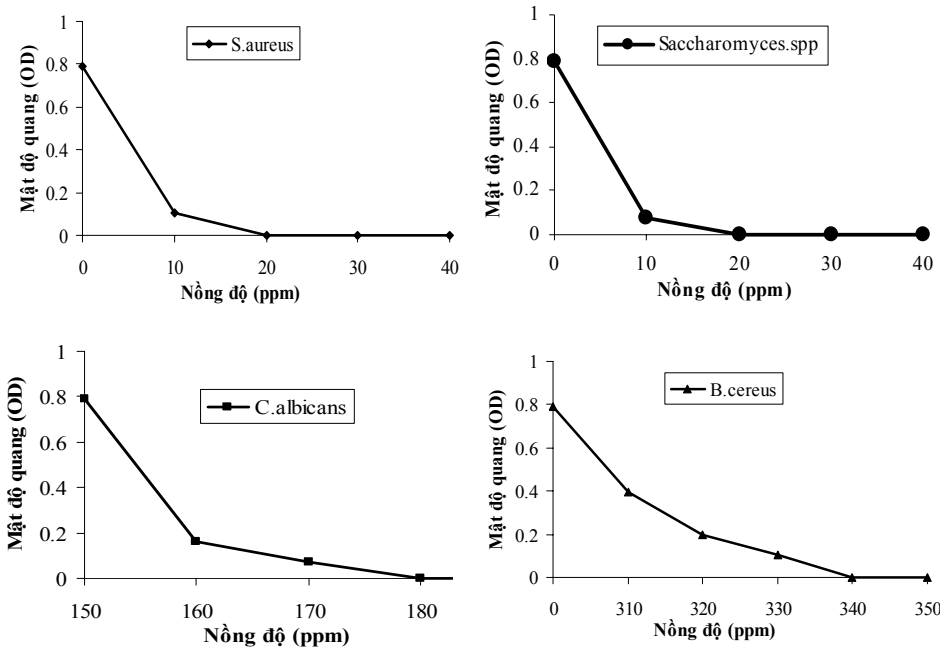
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng khuẩn của CMC lên chủng vi khuẩn

Sau khi tiến hành thí nghiệm theo những phương pháp trên, chúng tôi đã thu được những kết quả đo quang của môi trường có chất khảo sát CMC bằng số liệu được nêu trong bảng 1, và được thể hiện thông qua đường biểu diễn mật độ quang trên hình 1.

Bảng 1. Mật độ quang của môi trường khảo sát lên các chủng vi sinh vật sau 20 giờ

STT	Nồng độ CMC (ppm)	Mật độ quang (OD)			
		S.aureus	*Saccharomyces.spp*	*C.albicans*	*B.cereus*
Blank vsv	0	0,792	0,792	0,792	0,792
1	10	0,103	0,074	x	x
2	20	0,000	0,000	x	x
3	30	0,000	0,000	x	x
4	40	0,000	0,000	x	x
5	150	x	x	0,373	x
6	160	x	x	0,159	x
7	170	x	x	0,072	x
8	180	x	x	0,000	x
9	310	x	x		0,394
11	320	x	x		0,195
12	330	x	x		0,106
13	340	x	x		0,000
14	350	x	x		0,000
x: các thí nghiệm không được tiến hành					



Hình 1. Đường biểu diễn mật độ quang vi khuẩn sau 20 giờ nuôi cấy trong môi trường có chứa CMC

Khi trong môi trường có chứa chất khảo sát CMC, sự thay đổi nồng độ chất khảo sát có ảnh hưởng tới mật độ của vi sinh vật từ đó dẫn tới sự thay đổi chỉ số đo quang qua mỗi lần đo. Qua đồ thị ta thấy đường biểu diễn sự sinh trưởng của *S.aureus*, *Saccaromyces.spp*, *Candida albicans* và *B.cereus* giảm dần khi nồng độ của CMC trong dung dịch tăng lên và ngưng hẳn ở nồng độ 20 ppm đối với *S.aureus* và *Saccaromyces.spp*, 180 và 340 ppm tương ứng với *Candida albicans* và *B.cereu*. Điều này có nghĩa là vi khuẩn *S.aureus* bị ức chế hoàn toàn bởi CMC tại nồng độ 20 ppm, so sánh với kết quả của tác giả Liu [4] khi khảo sát phức kẽm thiourea chitosan (Zn-TC) và phức bạc của thiourea chitosan (Ag-TC) lên khả năng phát triển của loại vi khuẩn này cho thấy Zn-TC có khả năng ức chế *S.aureus* tại nồng độ 30 và 25 ppm và của chitosan là 20 ppm. Hình 1 cho thấy đường biểu diễn sinh trưởng của *B.cereus* giảm dần từ nồng độ 0 ppm đến 340 ppm và ngừng hẳn ở nồng độ này nghĩa là *B.cereus* bị ức chế hoàn toàn bởi CMC tại nồng độ 340 ppm. Trong nghiên cứu của tác giả Lui nồng độ chitosan tác động lên *B.cereus* là 1000 ppm, nồng độ tác động tối thiểu cao hơn nhiều so với CMC, chứng tỏ rằng khi thực hiện phản ứng tạo dẫn xuất CMC của chitosan đã làm tăng khả năng kháng *B.cereus*. Qua các kết quả trên cho thấy: CMC không những có khả năng ức chế vi sinh vật mà còn là chất dễ điều chế, giá thành lại rẻ hơn Zn-TC và Ag-TC. Vì vậy nghiên cứu những ứng dụng của CMC có tiềm năng rất lớn trong bảo quản thực phẩm và trong y dược.

4. KẾT LUẬN

Qua công trình này nhóm nghiên cứu chúng tôi đã tổng hợp thành công CMC bằng phương pháp gia nhiệt vi sóng đồng thời bước đầ nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của CMC trên *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Candida albicans* và *Saccaromyces.spp*. Nồng độ tác động tối thiểu của CMC lên *Staphylococcus aureus* là 20 ppm, *Bacillus cereus* 340 ppm, *Saccharomyces. spp* 20 ppm và *Candida albicans* là 180 ppm.

CMC tác động lên *S.aureus* và *Saccharomyces spp* mạnh hơn tác động lên *B.cereus và Candida albicans* đồng thời CMC có khả năng tác động đến sự phát triển của *S.aureus* và *B.cereus* mạnh hơn so với chitosan.CMC có tác động khác nhau lên sự phát triển của nấm men. Điều này mở ra một hướng là ứng dụng khả năng kháng khuẩn của CMCs vào lĩnh vực bảo quản các sản phẩm nhằm chống lại tác hại của những loại nấm men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

4. J Einfeldt, D Meiner, A K wasniewski (2004), “Chitin and chitosan”, *Polysaccarides,* 224–238.
5. L Sun, Y Yu, L Fan, X Chen, J Yang (2006), "Preparation, charaterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethylchitosan and application as pulp – cap", *Polymer* 47, 1796–804.
6. L Kong, Y Gao, G Lu, Y Gong, N Zhao, X Zhang (2006) “A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering” *European Polymer Journal* 42, 3171–3179.
7. X F Liu, Y L Guan, D Z Yang, Z Li, K D Yao (2001), “Antibacterial action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan”, *Polymer Science,* 79, 1324–1335.

SUMMARY

The carboxymethyl chitosan (CMC) was successfully prepared in this study, may exhibit potential antibacterial activity as their unique character. The purpose of this study was to evaluate the in vitro antibacterial activity of carboxymethyl chitosan. The antibacterial activity of CMC against Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Candida albicans and Saccaromyces.spp was evaluated by calculation of minimum inhibitory concentration (MIC). Results show CMC could inhibit the growth of various bacteria tested. Their MIC values were less than 20 ppm for S.aureus and Saccharomyces sp, 340 ppm for Bacillus cereus, and 180 ppm for Candida albicans.