



TỔNG HỢP NANO NHŨ TƯƠNG TINH DẦU SẢ-CHITOSAN KẾT HỢP SÓNG SIÊU ÂM VỚI NATRI TRIPOLYPHOSPHATE VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM

Võ Văn Quốc Bảo^{1*}, Trần Bảo Khánh¹, Lê Thị Kim Anh¹, Đinh Thị Thu Thanh¹, Nguyễn Thị Quỳnh Anh¹, Nguyễn Quốc Sinh¹, Đào Lê Minh Tuấn¹, Hoàng Thị Như Hạnh¹, Nguyễn Thị Diễm Hương¹, Dương Thị Phương Thuận¹, Trương Thị Mẫn Thi¹, Trương Hữu Phước², Võ Nguyễn Hải Châu², Lê Lâm Sơn², Đào Anh Quang³, Nguyễn Văn Phương⁴

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Huế, Việt Nam

³ Trường Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

⁴ Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt. Nghiên cứu này trình bày quá trình tổng hợp hệ nano nhũ tương từ tinh dầu sả (*Cymbopogon* spp.) và chitosan, sử dụng sóng siêu âm kết hợp với natri tripolyphosphate (TPP) nhằm nâng cao tính ổn định và khả năng kháng nấm. Các mẫu nhũ tương nano được thiết kế có và không có bổ sung thành phần TTP được khảo sát các tích chất của hệ nano, độ ổn định sau 90 ngày, cùng với khảo sát tính kháng nấm. Kết quả cho thấy, mẫu không bổ sung TTP (nanoTDS-Chi3) và các mẫu có bổ sung TPP (nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4) đều đạt kích thước giọt lỏng dưới 200 nm cùng với chỉ số đa phân tán (pDi) dưới 0,3, cho thấy sự đồng nhất cao trong cấu trúc hạt. Đặc biệt, mẫu nanoTDS-Chi-TPP3 thể hiện khả năng kháng nấm tốt nhất với hiệu lực ức chế đạt 100% đối với nấm *Colletotrichum musae* QB6 gây bệnh thán thư trên quả chuối Già lùn (*Musa* AAA). Việc bổ sung TPP đã tạo ra mạng lưới liên kết chéo ổn định giữa các hạt chitosan, giúp duy trì hoạt tính sinh học và ngăn ngừa tách pha trong thời gian dài, cụ thể mẫu nano TDS-Chi-TPP3 vẫn duy trì đặc tính của hệ nano nhũ tương sau 90 ngày lưu trữ. Kết quả nghiên cứu này mở ra triển vọng phát triển các giải pháp sinh học bền vững và an toàn trong nông nghiệp, hướng đến việc nâng cao chất lượng sản phẩm và bảo vệ môi trường.

Từ khóa: Chitosan, *Colletotrichum musae*, nano nhũ tương, natri tripolyphosphate, tinh dầu sả

* Liên hệ: vvqbao@hueuni.edu.vn

Synthesis of lemongrass essential oil–chitosan nanoemulsions via ultrasonication with sodium tripolyphosphate and evaluation of antifungal activity

Vo Van Quoc Bao^{1*}, Tran Bao Khanh¹, Le Thi Kim Anh¹, Dinh Thi Thu Thanh¹, Nguyen Thi Quynh Anh¹, Nguyen Quoc Sinh¹, Dao Le Minh Tuan¹, Hoang Thi Nhu Hanh¹, Nguyen Thi Diem Huong¹, Duong Thi Phuong Thuan¹, Truong Thi Man Thi¹, Truong Huu Phuoc², Vo Nguyen Hai Chau², Le Lam Son², Dao Anh Quang³, Nguyen Van Phuong⁴

¹Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University, Hue, Vietnam

²University of Science, Hue University, Hue, Vietnam

³School of Engineering and Technology, Duy Tan University, Danang, Vietnam

⁴University of Science and Technology of Hanoi, VAST, 18 Hoang Quoc Viet St., Hanoi, Vietnam

Abstract. This study presents the synthesis of various nanoemulsion systems using lemongrass essential oil (*Cymbopogon* spp.) and chitosan, employing ultrasound in conjunction with sodium tripolyphosphate (TPP) to enhance stability and antifungal properties. Nanoemulsion samples, both with and without TPP supplementation, were investigated for their nanosystem properties, stability over a 90-day storage period, and antifungal efficacy. Results indicate that the sample without TPP supplementation (nano TDS-Chi3) and the samples with TPP supplementation (nano TDS-Chi-TPP3 and nano TDS-Chi-TPP4) achieved droplet sizes below 200 nm and polydispersity index (pDi) values below 0.3, reflecting high homogeneity in particle structure. Notably, the sample nano TDS-Chi-TPP3 demonstrated exceptional antifungal activity, achieving 100% inhibition against *Colletotrichum musae* QB6, the pathogen causing anthracnose in post-harvest bananas. The incorporation of TPP formed a stable cross-linking network among the chitosan particles, maintaining biological activity and preventing phase separation over time; specifically, the nano TDS-Chi-TPP3 sample retained its nanoemulsion characteristics after 90 days of storage. These findings highlight the potential for developing sustainable and safe biological solutions in agriculture, aimed at improving product quality and environmental protection.

Keywords: Chitosan, *Colletotrichum musae*, lemongrass essential oil, nano emulsion, sodium tripolyphosphate

1 Giới thiệu

Nano nhũ tương từ tinh dầu thiên nhiên đã và đang thu hút sự quan tâm lớn trong các lĩnh vực bảo quản thực phẩm và nông sản do khả năng ngăn ngừa vi sinh vật gây hại, giúp kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm [1]. Trong số các loại tinh dầu được sử dụng, tinh dầu sả (*Cymbopogon* spp.) nổi bật nhờ khả năng kháng khuẩn và kháng nấm mạnh mẽ, đặc biệt hữu ích trong bảo quản và kiểm soát bệnh trên các sản phẩm nông nghiệp. Tuy nhiên, tinh dầu sả (TDS) thường dễ bị bay hơi và phân hủy khi gặp ánh sáng hoặc nhiệt độ cao, gây khó khăn trong việc

bảo quản lâu dài và duy trì hiệu quả hoạt tính. Để khắc phục những hạn chế trên, tinh dầu sả có thể được nhũ tương hóa ở kích thước nano, tạo ra một hệ nhũ tương có kích thước hạt đồng đều, ổn định và giúp tăng khả năng kiểm soát giải phóng hoạt chất. Các hạt nhũ tương nano có thể bảo vệ tinh dầu sả khỏi sự phân hủy và bay hơi, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho khả năng tương tác với các thành phần kháng khuẩn khác như chitosan (Chi). Chitosan, một polyme tự nhiên với tính kháng khuẩn kháng nấm cao cũng như phân hủy sinh học cao, đã được chứng minh là một chất mang lý tưởng khi kết hợp với các tinh dầu thiên nhiên, giúp tạo ra hệ nhũ tương nano tinh dầu sả-chitosan (nano TDS-Chi) bền vững và an toàn cho môi trường [2]. Tuy nhiên, nano TDS-Chi cũng gặp phải một số hạn chế về độ ổn định, đặc biệt là khi lưu trữ dài hạn. Để nâng cao tính ổn định, các nhà nghiên cứu đã áp dụng phương pháp rung siêu âm, một kỹ thuật tạo hạt nano thông qua cơ chế phân cắt mạnh mẽ, giúp làm giảm kích thước và đồng nhất kích thước hạt. Sóng siêu âm không chỉ tăng cường khả năng phân tán mà còn tạo điều kiện tối ưu cho sự tương tác giữa tinh dầu sả và chitosan, từ đó cải thiện tính bền của hệ nhũ tương nano. Một số nghiên cứu như Liu và cs., Bào và cs., Ahari và Nasiri, Liu và Liu, Đạt, Hương, cho thấy rằng rung siêu âm hỗ trợ tạo hạt nano có kích thước nhỏ và đồng đều hơn, giúp tăng cường khả năng bảo quản và hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano [3-8].

Ngoài ra, để cải thiện thêm độ ổn định và khả năng kháng nấm của hệ nano TDS-Chi, natri tripolyphosphate (TPP) được sử dụng như một chất tạo liên kết ion trong cấu trúc nhũ tương. TPP tạo ra một mạng lưới liên kết chéo với chitosan, giúp các hạt nano TDS-Chi có khả năng duy trì cấu trúc ổn định hơn trong thời gian dài, giảm hiện tượng kết tụ và phân hủy do môi trường tác động. Theo nghiên cứu của Su và cs., việc kết hợp TPP với nano chitosan giúp tạo ra một mạng lưới gel bảo vệ hạt nano khỏi tác động của nhiệt độ và ánh sáng để hệ nhũ tương ổn định [9]. Cùng quan điểm, Shah và cs. cũng đưa ra công bố về sự kết hợp hữu hiệu của TPP và Chitosan trong quá trình tổng hợp hệ nhũ tương Pickering (hệ phân tán ổn định) ngăn cản quá trình tách pha từ đó gia tăng tính ổn định, để ứng dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản [10]. Phương pháp rung siêu âm kết hợp với TPP trong việc tổng hợp nano nhũ tương đã cho thấy hiệu quả đáng kể trong việc ổn định cấu trúc và duy trì kích thước hạt đồng đều [11, 12]. Rung siêu âm không chỉ giúp tạo ra các hạt nano nhỏ hơn, đồng thời với sự hiện diện của TPP, mà còn giúp tăng khả năng bền vững của hệ nhũ tương, từ đó duy trì hoạt tính sinh học của tinh dầu sả và chitosan trong thời gian dài. Nghiên cứu của Travičić và cs. cho thấy, hệ nano TDS-Chi có bổ sung TPP và xử lý bằng rung siêu âm có khả năng kháng nấm cao đối với một loại nấm gây bệnh phổ biến trên trái cây, giúp bảo vệ sản phẩm nông sản sau thu hoạch [13].

Mục đích của nghiên cứu này nhằm tổng hợp hệ nano nhũ tương từ tinh dầu sả và chitosan, sử dụng phương pháp rung siêu âm kết hợp với natri tripolyphosphate để tạo nên một hệ thống ổn định, kích thước hạt đồng đều và thử nghiệm khả năng kháng nấm. Các công thức nhũ tương nano được đánh giá qua các chỉ số về kích thước giọt lỏng, chỉ số đa phân tán (pDI) và khả năng kháng nấm đối với *Colletotrichum musae* trên chuối sau thu hoạch. Kết quả nghiên cứu kỳ vọng sẽ đóng góp vào lĩnh vực bảo quản nông sản, đồng thời mở rộng khả năng ứng dụng của các hệ nano nhũ tương từ tinh dầu thiên nhiên trong bảo quản thực phẩm.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Tinh dầu sả (*Cymbopogon* spp.) được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Khoa Cơ khí và Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Tinh dầu được chiết xuất từ lá và thân sả tươi bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Quá trình chưng cất được thực hiện trong thời gian từ 4 đến 6 giờ, ở nhiệt độ dao động từ 100°C đến 105°C, đảm bảo tối ưu hóa hiệu suất chiết xuất và chất lượng của tinh dầu. Sau khi thu được, tinh dầu được bảo quản trong lọ thủy tinh tối màu và lưu trữ ở nhiệt độ thấp để giữ nguyên các đặc tính hóa lý. Chitosan có nguồn gốc từ vỏ tôm cua (trọng lượng phân tử $1,86 \times 10^5$ Da, khử acetyl 85-90%) được mua từ Công ty TNHH Chitosan Việt Nam. Acid axetic (Merck 64-19-7, Đức), Tween 80 và natri tripolyphosphate (Kdchemical, Hàn Quốc) và các thuốc thử hóa học phân tích khác được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Khoa Cơ khí và Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm và Khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Nấm *Colletotrichum musae* QB6 (*C. musae* QB6) gây bệnh thán thư hại chuối được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Vi sinh, Bộ môn Công nghệ thực phẩm, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA (potato dextrose agar) ở 28 °C. Một lít môi trường có chứa 20 g dextrose, 20 g agar và nước lú của 250 g khoai tây trắng, bổ sung nước cất vừa đủ.

2.2 Chuẩn bị nano nhũ tương TDS-Chi có hỗ trợ sóng siêu âm

Nano nhũ tương TDS-Chi được điều chế từ sự kết hợp giữa chitosan và tinh dầu sả chanh (TDS) với sự hỗ trợ của sóng siêu âm để đạt được cấu trúc hạt nano và kích thước đồng đều. Trước tiên, dung dịch nhũ tương TDS được chuẩn bị bằng cách phối trộn tinh dầu sả chanh với chất nhũ hóa Tween 80 ở tỷ lệ 1:9 (w/w). Quá trình trộn được thực hiện trên máy khuấy từ ở tốc độ 500 vòng/phút trong 2 giờ không cần gia nhiệt. Sau khi hoàn tất quá trình nhũ tương, dung dịch TDS được phối trộn với dung dịch chitosan 1% (w/v). Hỗn hợp này tiếp tục được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học ở tốc độ cao 1200 vòng/phút nhằm phân tán đồng đều chitosan trong pha nhũ tương. Tiếp theo, hỗn hợp được xử lý bằng thiết bị siêu âm ở tần số 37 kHz trong thời gian 10 phút để giảm kích thước giọt nhũ tương xuống quy mô nano, đồng thời tăng độ ổn định của hệ nhũ tương thông qua hiện tượng phân tách hạt và phân tán hạt nhỏ hơn dưới tác động của lực siêu âm. Kết quả thu được là các dung dịch nano nhũ tương với các tỷ lệ phối trộn TDS và Chitosan (w/w) khác nhau: 1:1, 0,75:1, 0,5:1 và 0,25:1, được mã hóa lần lượt là nanoTDS-Chi1, nanoTDS-Chi2, nanoTDS-Chi3 và nanoTDS-Chi4.

2.3 Chuẩn bị nano nhũ tương TDS-Chi có hỗ trợ sóng siêu âm và TPP

Nano nhũ tương TDS-Chi được điều chế bằng phương pháp tạo gel nhũ tương ion, giữa sự kết hợp giữa chitosan, tinh dầu sả và natri tripolyphosphate (TPP), cùng sự hỗ trợ của sóng siêu âm để tăng cường tính ổn định và đồng đều kích thước hạt nano. Quy trình điều chế bắt đầu bằng việc chuẩn bị dung dịch nhũ tương tinh dầu sả (TDS) và phối trộn với dung dịch chitosan

1% (w/v) bằng máy khuấy cơ học ở tốc độ 1200 vòng/phút với các tỷ lệ như mục 2.2. Tuy nhiên, ở phương pháp này, nhằm tạo mạng lưới gel và ổn định cấu trúc nano nhũ tương, dung dịch TPP 5 mg/mL (w/v) được nhỏ từ từ vào hỗn hợp TDS-Chi và khuấy ở tốc độ cao (1200 vòng/phút) trong 15 phút để đảm bảo TPP phản ứng đều với chitosan, hình thành các liên kết chéo ion, từ đó gia tăng độ bền của hệ thống [14]. Cuối cùng, hỗn hợp được xử lý bằng thiết bị siêu âm ở tần số 37 kHz trong thời gian 10 phút nhằm giảm kích thước giọt xuống quy mô nano, tăng độ đồng nhất và ổn định của hệ nhũ tương. Kết quả thu được là các dung dịch nano nhũ tương với các công thức tương ứng được mã hóa là nanoTDS-Chi-TPP1, nanoTDS-Chi-TPP2, nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4.

2.4 Khảo sát độ ổn định của nano nhũ tương sau 90 ngày

Để đánh giá mức độ ổn định của hệ nano nhũ tương TDS-Chi, các mẫu nhũ tương được theo dõi dựa trên chỉ số pDi và kích thước giọt lỏng qua thời gian bảo quản ở điều kiện thường sau 30, 60 và 90 ngày. Các thử nghiệm được lặp lại ba lần.

2.5 Khảo sát đặc tính của nano nhũ tương TDS-Chi

Để đánh giá đặc tính của hệ nano nhũ tương TDS-Chi, các phép đo đã được tiến hành thông qua xác định kích thước giọt lỏng và chỉ số đa phân tán (pDi).

Kích thước giọt lỏng và chỉ số đa phân tán kích thước hạt (Polydispersity Index - pDi) được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS) trên máy Malvern Zetasizer ZS. Đường kính trung bình của tiểu phân được biểu diễn dưới thông số Z-average (d.nm) và được gọi là hạt nano có kích thước giọt lỏng (KTGL). Chỉ số pDi có giá trị nằm trong khoảng 0 đến 1. Khi pDi < 0,3; kích thước mẫu phân bố hẹp, pDi > 0,3; mẫu có khoảng phân bố rộng. Nếu pDi quá lớn, gần bằng 1, kích thước vượt quá giới hạn đo của máy (ISO 22412:2017) [15]. Từ đó, chọn thông số ảnh hưởng thích hợp cho quá trình tổng hợp nano nhũ tương.

2.6 Khảo sát khả năng kháng nấm *Colletotrichum musae* QB6

Khảo sát khả năng kháng nấm *C. musae* QB6 của nano TDS-Chi được tiến hành theo Võ Văn Quốc Bảo và cộng sự [17]. Mẫu nấm *C. musae* QB6 được nuôi cấy trong điều kiện tiêu chuẩn ở nhiệt độ 28 °C trong 8 ngày để đảm bảo sự phát triển đồng đều. Sau thời gian nuôi cấy, một mảnh nấm có kích thước 2 × 2 mm được cắt từ rìa tản nấm và đặt vào trung tâm của các đĩa petri có đường kính 9 cm, trong đó chứa 15 mL dung dịch hỗn hợp gồm môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và nano nhũ tương TDS-Chi theo các công thức cần khảo sát. Đường kính tản nấm (ĐKTN) được đo sau 8 ngày theo dõi bằng thước kẹp điện tử nhằm ghi nhận sự phát triển của nấm trong các điều kiện có và không có (đối chứng) nano nhũ tương. Hiệu quả kháng nấm của hệ nano nhũ tương TDS-Chi được thể hiện thông qua phần trăm ức chế sự phát triển của nấm so với mẫu đối chứng. Công thức tính phần trăm ức chế sinh trưởng [16] như sau:

$$\text{Phần trăm ức chế (\%)} = \frac{\text{ĐKTN đối chứng} - \text{ĐKTN mẫu}}{\text{ĐKTN đối chứng}} \times 100 \%$$

trong đó: ĐKTN đối chứng là đường kính tán nãm trong mẫu không có nano nhũ tương; ĐKTN mẫu là đường kính tán nãm trong mẫu chứa nano nhũ tương

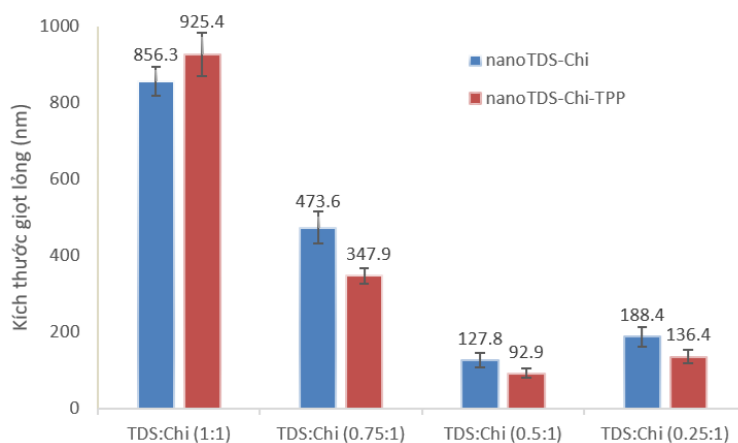
2.7 Phân tích thống kê

Các thí nghiệm được thiết kế theo mô hình hoàn toàn ngẫu nhiên. Phân tích phương sai (ANOVA) được thực hiện bằng phần mềm SPSS phiên bản 19.1 để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm mẫu. So sánh các giá trị trung bình được tiến hành qua kiểm định Duncan's Multiple Range Test (DMRT) với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tổng hợp nano nhũ tương TDS-Chi ảnh hưởng đến kích thước giọt lỏng

Kết quả cho thấy, kích thước giọt lỏng của các mẫu chịu ảnh hưởng vào việc bổ sung TPP cũng như tỷ lệ phối trộn giữa TDS và Chi. Đặc biệt, các mẫu có tỷ lệ TDS:Chi là 0,5:1 và 0,25:1 đạt kích thước giọt lỏng dưới 200 nm, nằm trong phạm vi kích thước của hệ nhũ tương nano và thể hiện sự đồng nhất tốt, đáp ứng tiêu chuẩn của ISO 22412:2017 [15]. Sự đồng đều trong phân bố kích thước hạt đã được khẳng định bởi Salvia-Trujillo và McClements khi nghiên cứu độ ổn định của hệ nhũ tương nano thông qua phương pháp đo cấu trúc vi mô, cho thấy các hạt có kích thước dưới 200 nm đạt độ đồng nhất cao [18]. Đồng quan điểm, Balasubramani và cs. cũng ghi nhận rằng việc kiểm soát kích thước giọt lỏng đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện độ ổn định và tính đồng nhất của hệ nhũ tương nano từ tinh dầu *V. Negundo* [19].

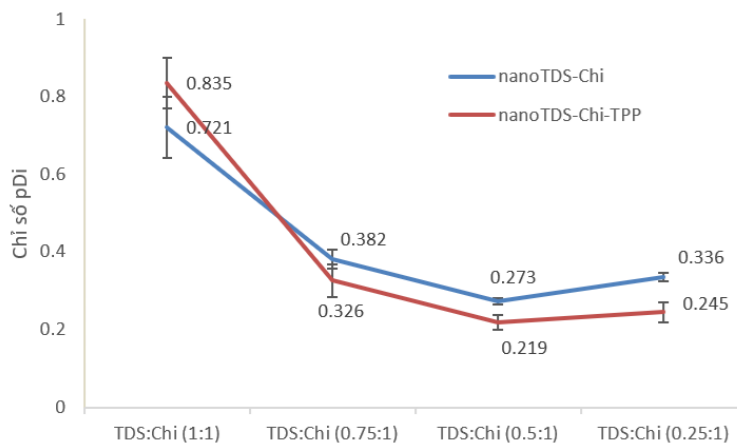


Hình 1. Biểu đồ thể hiện kích thước giọt lỏng của các mẫu nhũ tương TDS-Chi

Hơn nữa, khi so sánh giữa các công thức có và không có TPP (Hình 1), vai trò của TPP được thể hiện rõ rệt. Mẫu nano TDS-Chi-TPP có kích thước giọt lỏng nhỏ hơn và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu nano TDS-Chi. Điều này cho thấy TPP đóng vai trò quan trọng như một tác nhân liên kết ion, tạo ra một mạng lưới giúp phân tán các hạt đồng đều hơn. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh cho điều này: Bugnicourt và Ladavière nêu rõ rằng việc sử dụng TPP trong các công thức nhũ tương nano giúp tạo ra các liên kết chéo giữa các hạt, từ đó cải thiện tính đồng nhất và khả năng phân tán của các giọt lỏng [20]. Tương tự, Abdelgawad và Hudson cũng khẳng định rằng việc bổ sung TPP vào dung dịch chứa chitosan đã cải thiện tính chất vật lý của nano hạt, bao gồm kích thước hạt nhỏ hơn và độ đồng nhất cao hơn [21]. Tuy nhiên, để đạt tiêu chuẩn của hệ nhũ tương nano theo ISO 22412:2017, cần phải kết hợp khảo sát chỉ số pDi (Polydispersity Index) [15].

3.2 Tổng hợp nano nhũ tương TDS-Chi ảnh hưởng đến chỉ số pDi

Chỉ số pDi (Polydispersity Index) là một yếu tố quan trọng trong việc đánh giá sự đồng nhất của kích thước hạt trong các hệ nhũ tương nano [22]. Kết quả cho thấy chỉ số pDi của các mẫu phụ thuộc vào tỷ lệ phối trộn giữa tinh dầu sả (TDS) và chitosan (Chi), cũng như sự bổ sung TPP. Cụ thể, ở tất cả các tỷ lệ, khi thành phần tinh dầu sả giảm dần, chỉ số pDi cũng giảm và nhỏ hơn 0,3 khi bổ sung 50 % và 25% so với chitosan (w/w) và có khoảng phân bố kích thước hạt hẹp và đồng đều tốt. Quan sát tỷ lệ TDS:Chi= 0,25:1 (Hình 2), chỉ số pDi lại tăng dần lên cũng như kích thước giọt lỏng đã được nêu ở phần trước (Hình 1). Hiện tượng này có thể giải thích, tỷ lệ này có nồng độ của các tiểu phân quá loãng dẫn đến mật độ các hạt trong một đơn vị thể tích giảm. Các hạt có xu hướng dao động mạnh hơn và ngược lại, nồng độ của các tiểu phân quá lớn có thể làm giảm khả năng nhũ hóa, gây tăng tính lưu biến và ảnh hưởng đến phép đo tán xạ ánh sáng động (DLS). Quan điểm này phù hợp với công bố của Panchal và cs., khi xác định chỉ số pDi bằng phương pháp DLS [23]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Hương khi xác định chỉ số pDi trong quá trình tổng hợp nhũ tương nano tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc ứng dụng làm vật liệu kháng khuẩn, chỉ ra rằng giá trị nhỏ hơn 0,3 phản ánh sự đồng nhất tốt của hệ nhũ tương [8].



Hình 2. Biểu đồ thể hiện chỉ số pDi của các mẫu nhũ tương TDS-Chi

Mẫu ký hiệu nanoTDS-Chi4 có chỉ số pDi bằng 0,336 trong khi đó mẫu nanoTDS-Chi-TPP4 vẫn còn dưới 0,3 (0,245). Kết quả này càng khẳng định vai trò của TPP trong việc cải thiện độ ổn định và khả năng phân tán của các hạt trong hệ nhũ tương. TPP hoạt động như một tác nhân liên kết ion, tạo ra một mạng lưới liên kết chéo giữa các hạt chitosan, từ đó cải thiện độ đồng nhất và ổn định của hệ nhũ tương. Sự bổ sung TPP giúp làm giảm khả năng tách pha, qua đó tăng cường tính ổn định cho các ứng dụng trong thực phẩm và dược phẩm, như được nhấn mạnh trong các nghiên cứu của Balasubramani và cs., Yousefi và cs. và Espinosa-Andrews và cs. [11, 19, 24].

Tổng hợp các kết quả từ Hình 1 và Hình 2 cho thấy các mẫu được ký hiệu nanoTDS-Chi3, nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4 đều đạt tiêu chuẩn hệ nhũ tương nano theo ISO 22412:2017 và sẽ được chọn để khảo sát tính ổn định cũng như thử khả năng kháng nấm *C. musa* QB6 trong các nghiên cứu tiếp theo.

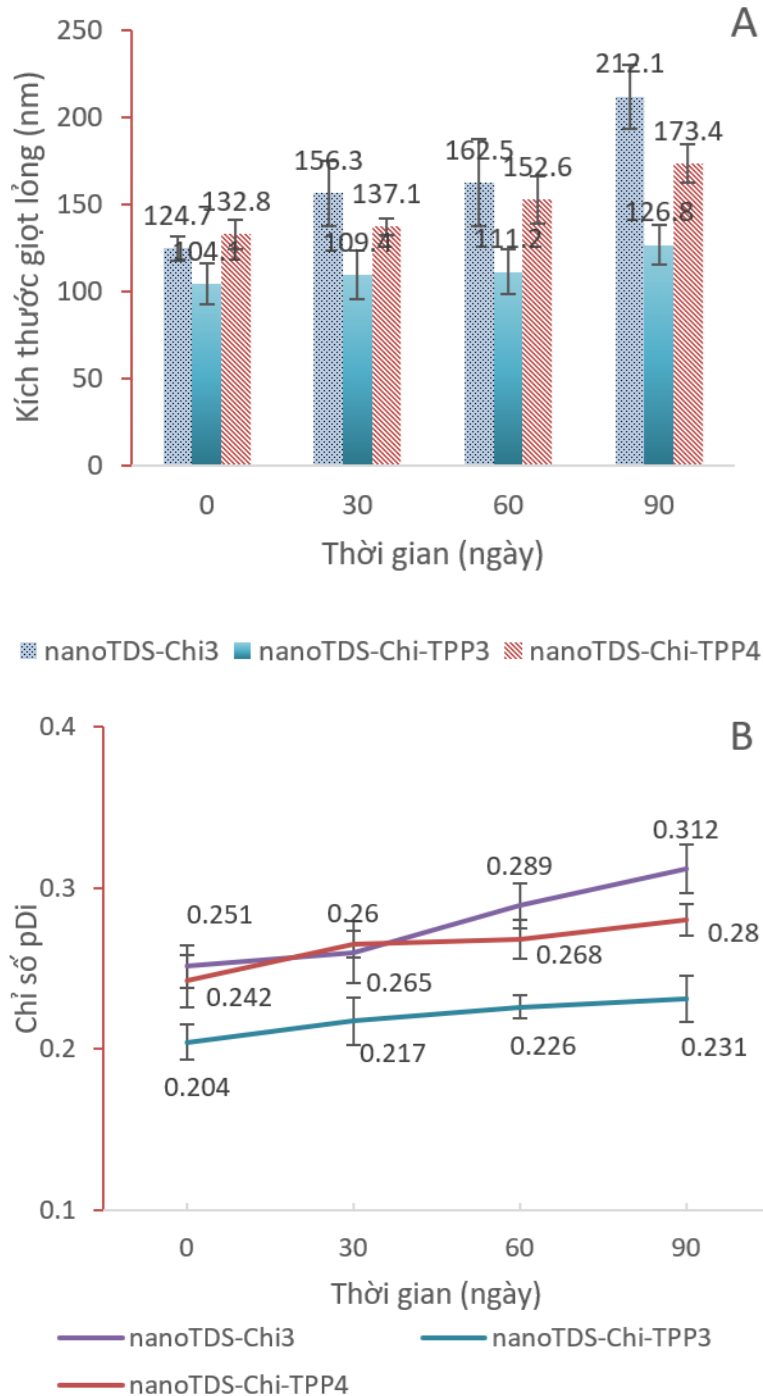
3.3 Độ ổn định của nano nhũ tương TDS-Chi

Kết quả từ biểu đồ cho thấy sự ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến độ ổn định của các mẫu nanoTDS-Chi3, nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4. Việc lựa chọn ba mẫu này để theo dõi tiếp theo dựa trên tiêu chí đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn hệ nhũ tương nano theo ISO 22412:2017, tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu mở rộng. Chỉ số pDi và sự thay đổi kích thước giọt lỏng được theo dõi qua các thời điểm 0, 30, 60 và 90 ngày đã có sự biến đổi nhất định. Biểu đồ thứ nhất (Hình 3A) cho thấy rõ sự thay đổi trong kích thước giọt lỏng của các mẫu nhũ tương qua thời gian. Đáng chú ý, mẫu nanoTDS-Chi3 có xu hướng tăng kích thước giọt lỏng nhanh chóng, đạt giá trị 212,1 nm sau 90 ngày theo dõi. Trong khi đó, các mẫu nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4, duy trì kích thước giọt lỏng ổn định hơn qua thời gian, cho thấy việc bổ sung TPP đã có tác động tích cực trong việc duy trì hệ nhũ hóa.

Bên cạnh đó, biểu đồ thứ 2 (Hình 3B) cũng cho thấy chỉ số pDi tăng nhẹ từ 0 đến 90 ngày và các mẫu có bổ sung TPP thể hiện chỉ số pDi thấp hơn so với mẫu không có bổ sung. Cụ thể, mẫu nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4 vẫn duy trì chỉ số pDi dưới 0,3, cho thấy sự đồng nhất cao trong phân bố kích thước giọt lỏng. Ngược lại, mẫu nanoTDS-Chi3 có giá trị pDi đạt 0,312 ở ngày thứ 90, phản ánh mức độ phân tán cao hơn và sự không ổn định trong hệ nhũ tương. Kết quả này càng khẳng định việc bổ sung TPP không chỉ giúp cải thiện tính đồng nhất của hệ nhũ tương mà còn duy trì độ ổn định trong thời gian dài.

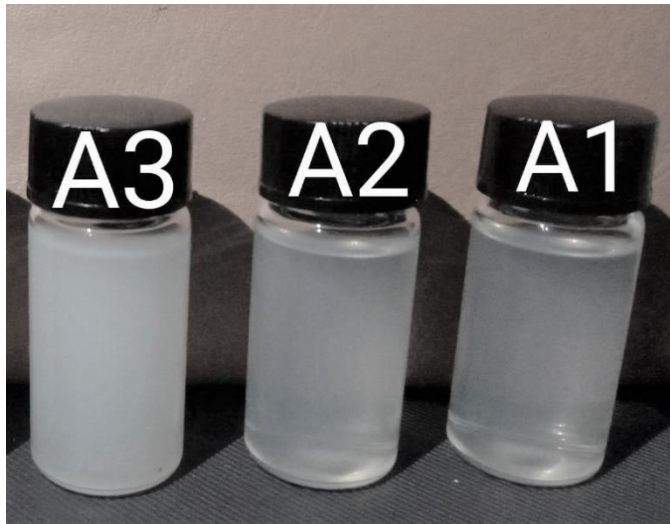
Vai trò của TPP như một chất liên kết ion, tạo liên kết chéo giữa các nhóm amine proton hóa ($-NH_3^+$) của chitosan với các nhóm phosphate ($-P=O$, $-P-OH$) của TPP. Mạng lưới liên kết chéo này giúp ổn định cấu trúc các hạt nano, hạn chế hiện tượng kết tụ và duy trì tính đồng nhất trong phân bố kích thước. Liên kết chéo ion này không chỉ giảm sự chuyển động tự do của các tiểu phân mà còn hạn chế nguy cơ tách pha trong quá trình bảo quản [25, 26]. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc phát triển và bảo quản các sản phẩm nhũ tương trong ngành thực phẩm và dược phẩm, nơi mà tính ổn định và hiệu quả là yếu tố then chốt. Các nghiên cứu trước đây cũng đồng quan điểm với kết quả này. Balasubramani và cs. đã công bố việc sử dụng TPP không chỉ tạo ra mạng lưới liên kết chéo giữa các hạt chitosan mà còn làm tăng cường tính ổn định của hệ nhũ tương qua thời gian [19]. Tương tự, nghiên cứu của Yousefi và cs. khẳng định rằng TPP

đóng vai trò quan trọng trong việc giảm sự tách pha và tăng cường khả năng phân tán của các hạt trong hệ thống nhũ tương [24].



Hình 3. Biểu đồ thể hiện kích thước giọt lỏng (A) và chỉ số pDi (B) của các mẫu nhũ tương TDS-Chi

Hình 4 cho thấy sau 90 ngày lưu trữ, mẫu nanoTDS-Chi3 (A3, không bổ sung TPP) xuất hiện hiện tượng tách pha và giảm độ trong suốt rõ rệt so với các mẫu có bổ sung TPP như nanoTDS-Chi-TPP3 (A2) và nanoTDS-Chi-TPP4 (A1). Kết quả phân tích kích thước giọt lỏng và chỉ số pDi cũng khẳng định nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4 có tính ổn định tốt hơn so với nanoTDS-Chi3. Những kết quả này nhấn mạnh vai trò quan trọng của TPP trong việc duy trì độ ổn định và khả năng phân tán của các hạt nhũ tương, tạo tiền đề cho các ứng dụng tiềm năng trong ngành thực phẩm, dược phẩm và công nghệ nano.



Hình 4. Các mẫu sau 90 ngày lưu trữ: nanoTDS-Chi3 (A3), nanoTDS-Chi-TPP3 (A2) và nanoTDS-Chi-TPP4 (A1)

3.4 Khảo sát khả năng kháng nấm *Colletotrichum musae* QB6

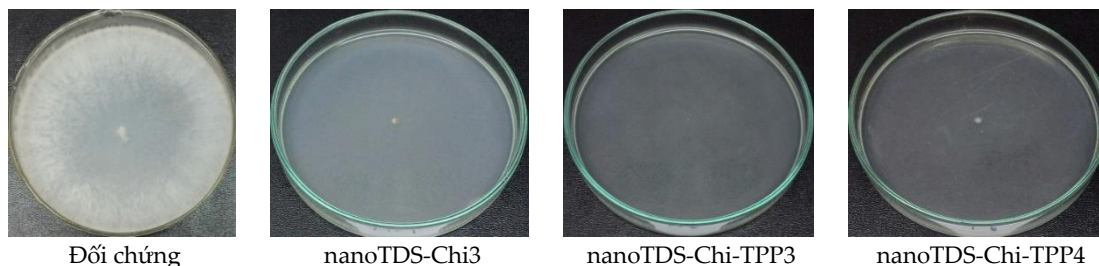
Để đánh giá khả năng kháng nấm, nghiên cứu đã sử dụng các mẫu nanoTDS-Chi3, nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi-TPP4 sau 90 ngày bảo quản trên nấm *Colletotrichum musae* QB6 - tác nhân gây bệnh thán thư nghiêm trọng trên chuối Già lùn, một loại chuối phổ biến và có giá trị kinh tế cao. Nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 28°C. Kết quả cho thấy các mẫu nano TDS-Chi, ngay cả khi không bổ sung TPP, đều thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm rất tốt. Trong khi đó, mẫu đối chứng không có dung dịch nano cho thấy sự phát triển mạnh mẽ, với đường kính tán nấm đạt 9 cm sau 8 ngày.

Kết quả từ Bảng 1 và Hình 4 cho thấy nanoTDS-Chi-TPP3 có hiệu lực kháng nấm cao nhất, đạt 100%, với đường kính tán nấm hoàn toàn bị ức chế. NanoTDS-Chi-TPP4 cũng đạt hiệu quả ức chế cao (97,02%), trong khi nanoTDS-Chi3 đạt mức 89,72% với đường kính tán nấm là 0,925 cm sau 8 ngày. Thời gian theo dõi 8 ngày được lựa chọn dựa trên chu kỳ sinh trưởng của nấm *Colletotrichum musae*, trong đó nấm thường đạt kích thước tán tối đa và biểu hiện rõ ràng các dấu hiệu phát triển, giúp đánh giá hiệu quả ức chế của các mẫu nano một cách toàn diện. Kết quả này chứng minh rằng việc bổ sung TPP trong công thức nano TDS-Chi không chỉ nâng cao tính ổn định của hệ nhũ tương mà còn tăng cường hiệu lực kháng nấm đáng kể.

Bảng 1. Hiệu lực ức chế và đường kính tán nấm *Colletotrichum musae* QB6 của các mẫu nanoTDS-Chi sau 8 ngày theo dõi

Mẫu	Đường kính tán nấm (cm)				Hiệu lực ức chế sau 8 ngày (%)
	2 ngày	4 ngày	6 ngày	8 ngày	
Đối chứng	2,210 ^{bA} (±0,605)	3,841 ^{bB} (±0,412)	6,245 ^{bC} (±1,117)	9,000 ^{cD} (±0,000)	0,000
<i>nano TDS-Chi3</i>	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,925 ^{bB} (±0,102)	89,72
<i>nanoTDS-Chi-TPP3</i>	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	100,00
<i>nanoTDS-Chi-TPP4</i>	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,000 ^{aA} (±0,000)	0,268 ^{bB} (±0,081)	97,02

Ghi chú: Các chữ cái thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy $p < 0,05$, trong đó a, b, c theo cột và A, B, C, D theo hàng

**Hình 5.** Các mẫu nấm *Colletotrichum musae* QB6 sau 8 ngày theo dõi

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã tổng hợp thành công hệ nano nhũ tương từ tinh dầu sả và chitosan, sử dụng sóng siêu âm kết hợp với natri tripolyphosphate để cải thiện tính ổn định và khảo sát khả năng kháng nấm. Kết quả cho thấy các mẫu nanoTDS-Chi3, nanoTDS-Chi-TPP3 và nanoTDS-Chi4 có kích thước giọt lỏng dưới 200 nm và chỉ số đa phân tán (pDi) dưới 0,3, cho thấy sự đồng nhất cao của hệ nhũ tương. Đặc biệt, các mẫu này thể hiện khả năng kháng nấm vượt trội đối với nấm *C. musae* QB6 gây bệnh hại quả trên chuối sau thu hoạch, với hiệu lực ức chế đạt 100% sau 8 ngày đối với mẫu nanoTDS-Chi-TPP3. Sự bổ sung TPP đã tạo ra mạng lưới liên kết chéo ổn định hơn giữa các hạt chitosan, từ đó giảm thiểu sự tách pha và duy trì hoạt tính sinh học của hệ nhũ tương trong thời gian dài. Đáng chú ý, mẫu nanoTDS-Chi-TPP3 vẫn duy trì đặc tính của hệ nano nhũ tương sau 90 ngày lưu trữ, cho thấy tính ổn định bền vững của sản phẩm. Những kết quả này mở ra triển vọng cho việc ứng dụng các hệ nhũ tương nano từ tinh dầu thiên nhiên trong bảo

quản thực phẩm và nông sản, góp phần phát triển các giải pháp sinh học an toàn và hiệu quả trong nông nghiệp.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự tài trợ của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo [Mã số: B2023-ĐHH-21]

Tài liệu tham khảo

1. Hiền, L. T. M., Thu, T. T., Thu, P. T. A., Thảo, T. T. P., & Đào, Đ. T. A. (2020). Khảo sát khả năng bảo quản thịt của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu tạo thành bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao. *Tạp chí khoa học-kỹ thuật và công nghệ Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh*, 15(1), 47-57.
2. Nkede, F. N., Wardana, A. A., Phuong, N. T. H., Takahashi, M., Koga, A., Wardak, M. H., ... & Tanaka, F. (2023). Preparation and characterization of chitosan/lemongrass oil/cellulose nanofiber Pickering emulsions active packaging and its application on tomato preservation. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(11), 4930-4945.
3. Liu, M., Pan, Y., Feng, M., Guo, W., Fan, X., Feng, L., ... & Cao, Y. (2022). Garlic essential oil in water nanoemulsion prepared by high-power ultrasound: Properties, stability and its antibacterial mechanism against MRSA isolated from pork. *Ultrasonics Sonochemistry*, 90, 106201.
4. Bảo, V. V. Q., Phuong, N. N. T., Kim, A. L. T., Văn, T. N., Thanh, T. Đ., & Bảo, T. N. N. (2023). Ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình tổng hợp nano nhũ tương từ dầu bơ. *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 7(1), 3523-3532.
5. Ahari, H., & Nasiri, M. (2021). Ultrasonic technique for production of nanoemulsions for food packaging purposes: a review study. *Coatings*, 11(7), 847.
6. Liu, T., & Liu, L. (2020). Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. *International journal of biological macromolecules*, 162, 1509-1515.
7. Đạt, Đ. V. (2019). Tổng hợp nano nhũ tương từ tinh dầu vỏ cam sành ứng dụng làm vật liệu kháng khuẩn. *Journal of Science and Technology-IUH*, 39(03).
8. Hương, N. T. L. (2019). Tổng hợp nano nhũ tương trên nền tinh dầu bưởi kết hợp nano bạc ứng dụng làm vật liệu kháng khuẩn. *Journal of Science and Technology-IUH*, 39(03).
9. Su, S., Yin, X., Du, W., Han, L., Wu, Q., & Zhang, H. (2024). Novel concentrated O/W emulsion co-stabilized by like-charged chitosan nanoparticle and ethyl lauroyl arginate (LAE) surfactant at very low dosages. *LWT*, 191, 115692.
10. Shah, B. R., Dvořák, P., Velíšek, J., & Mráz, J. (2021). Opening a new gateway towards the applications of chitosan nanoparticles stabilized Pickering emulsion in the realm of aquaculture. *Carbohydrate Polymers*, 265, 118096.
11. Espinosa-Andrews, H., Barbosa-Nuñez, J. A., Martínez-Velázquez, M., Castillo-Herrera, G. A., & Haro-González, J. N. (2024). Effects of phosphate salts and ultrasonication on the formation and characteristics of phosphate-chitosan microparticles. *Food Physics*, 1, 100023.

12. Ahari, H., & Nasiri, M. (2021). Ultrasonic technique for production of nanoemulsions for food packaging purposes: a review study. *Coatings*, 11(7), 847.
13. Travičić, V., Cvanić, T., & Četković, G. (2023). Plant-Based Nano-Emulsions as Edible Coatings in the Extension of Fruits and Vegetables Shelf Life: A Patent Review. *Foods*, 12(13), 2535.
14. Lusiana, R. A., Protoningtyas, W. P., Wijaya, A. R., Siswanta, D., & Santosa, S. J. (2017). Chitosan-tripoly phosphate (CS-TPP) synthesis through cross-linking process: the effect of concentration towards membrane mechanical characteristic and urea permeation. *Orient. J. Chem*, 33(6), 2913-2919.
15. ISO 22412:2017, Particle size analysis—dynamic light scattering (DLS).
16. Al-Hetar, M. Y., Zainal, A. M. A., Sariah, M., Wong, M. Y. (2010). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434-2439.
17. Võ Văn Quốc Bảo và Trương Ngọc Đăng (2018). Nghiên cứu khả năng kháng nấm của chế phẩm nano Ag-TBS đối với *Macrophoma theicola* QB1 gây hại quả quýt (*Citrus deliciosa* T.). *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 127(1C), 131-139.
18. Salvia-Trujillo, L., & McClements, D. J. (2016). Influence of nanoemulsion addition on the stability of conventional emulsions. *Food Biophysics*, 11, 1-9.
19. Balasubramani, S., Rajendhiran, T., Moola, A. K., & Diana, R. K. B. (2017). Development of nanoemulsion from *Vitex negundo* L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (*Aedes aegypti* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 15125-15133.
20. Bugnicourt, L., & Ladavière, C. (2016). Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in polymer science*, 60, 1-17.
21. Abdelgawad, AM, & Hudson, SM (2019). Chitosan nanoparticles: Polyphosphate cross-linking and protein delivery properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 133-142.
22. de Oca-Ávalos, J. M. M., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2017). Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*, 16, 1-6.
23. Panchal, J., Kotarek, J., Marszal, E., & Topp, E. M. (2014). Analyzing subvisible particles in protein drug products: a comparison of dynamic light scattering (DLS) and resonant mass measurement (RMM). *The AAPS journal*, 16, 440-451.
24. Yousefi, M., Mohammadi, V. G., Shadnoush, M., Khorshidian, N., & Mortazavian, A. M. (2022). Zingiber officinale essential oil-loaded chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Fabrication, characterization and in-vitro antioxidant and antibacterial activities. *Food Science and Technology International*, 28(7), 592-602.
25. Huang, Y., Cai, Y., & Lapitsky, Y. (2015). Factors affecting the stability of chitosan/tripolyphosphate micro-and nanogels: resolving the opposing findings. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(29), 5957-5970.
26. Khoerunnisa, F., Nurhayati, M., Dara, F., Rizki, R., Nasir, M., Aziz, H. A., ... & Oparakasi, P. (2021). Physicochemical properties of TPP-crosslinked chitosan nanoparticles as potential antibacterial agents. *Fibers and Polymers*, 22(11), 2954-2964.