

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan kết hợp với chiết xuất lá bần ổi

Đào Thị Tô Uyên, Nguyễn Thị Thương, Hoàng Ngọc Bích*

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại Học Nguyễn Tất Thành

*hnbich@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Màng chitosan kết hợp với chiết xuất lá bần ổi (SO) được tổng hợp thành công bằng phương pháp phối trộn đơn giản. Kết quả thu được từ phân tích kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy bề mặt màng hỗn hợp thu được đồng nhất và không có vết nứt. Tương tác hydrogen giữa các phần hoạt tính của chiết SO với nhóm NH_2 hoạt tính của chitosan cũng được chứng minh qua phân tích quang phổ hồng ngoại (FTIR). Ngoài ra, kết hợp 1% nồng độ chiết xuất SO (wt/v) có thể cải thiện hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan thông qua khả năng ức chế hoàn toàn đối với hai loại vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella Typhimurium* và *Pseudomonas aeruginosa* sau 24 giờ nuôi cấy. Những kết quả đạt được cho thấy tiềm năng của màng chitosan kết hợp với chiết xuất bần ổi ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm.

Nhận 08.08.2019
Được duyệt 10.12.2019
Công bố 25.12.2019

Từ khóa

chitosan, chiết xuất bần ổi, màng kháng khuẩn, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Gần đây nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc phát triển bao gói thực phẩm có hoạt tính sinh học để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về an toàn thực phẩm của xã hội. Ngoài những tính chất chống thấm khí, hơi ẩm và nước, bao bì hoạt tính cần những chức năng bảo vệ chống lại sự thâm nhập của vi khuẩn nhằm kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm. Ngay từ năm 1968, K.Arai và cộng sự đã xác định chitosan hầu như không có tính độc, không gây độc trên động vật thực nghiệm và người. Nhiều tác giả chỉ rõ chitosan, chitosan glucosamine có tính chất cơ học tốt, dễ tạo màng và có nhiều đặc tính sinh học đa dạng như: có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm với nhiều chủng loại khác nhau, kích thích sự tăng sinh của tế bào, được bổ sung vào thực phẩm làm chất phụ gia và làm tác nhân giữ ẩm trong mỹ phẩm[1,2]. Hiện nay, chitosan, chitin và chitosan oligomer là những vật liệu mới đã và đang được ứng dụng rất phổ biến trong các lĩnh vực như: công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp, dược phẩm, y tế, môi trường, công nghệ sinh học và vật liệu mới. Tùy thuộc vào từng lĩnh vực mà sử dụng chitosan ở các mức độ tinh sạch khác nhau[3]. Năm 2007, nhóm tác giả Po-Jung Chien, Fuu Sheu, Feng-Hsu Yang đã nghiên cứu việc sử dụng màng chitosan để bảo quản xoài ở 6°C. Qua nghiên cứu, các tác giả này đã kết luận rằng: chitosan làm chậm sự mất nước và giảm chất

lượng giác quan, làm tăng hàm lượng chất rắn hòa tan, tăng độ axit chuẩn độ và hàm lượng axit ascorbic, giảm nứt bề mặt. Nó cũng ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Dữ liệu cho thấy, việc áp dụng lớp phủ chitosan kéo dài hiệu quả các thuộc tính chất lượng và kéo dài thời hạn sử dụng của trái xoài[4]. Năm 2013, nhóm tác giả Natalia Susenoa, Emma Savitria, Lanny Sapeia, Karsono S. Padmawijaya đã dùng chitosan 2% với mức độ decetyl hóa 80% và không bổ sung chất nhũ hóa TEA để bảo quản chuối Cavendish. Kết quả cho thấy rằng: Chitosan làm chậm quá trình chín của chuối, duy trì chất lượng và thời gian bảo quản chuối trong vài ngày[5]. Năm 2016, nhóm tác giả Jorge M. Vieiraa, María L. Flores-Lópezb, Diana Jasso de Rodríguezc, Maria C. Sousaad, António A. Vicenteb, Joana T. Martins đã kết hợp Chitosan và chiết xuất Aloe vera bảo quản quả việt quất ở 5°C. Phương pháp này kéo dài thời gian bảo quản việt quất lên tới 15 ngày, tăng trưởng vi sinh và mức độ mất nước đã giảm 30-40%[6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp màng composit có thể ăn được dựa trên sự kết hợp của chitosan (CH) và chiết xuất bần ổi (SO) có tiềm năng ứng dụng trong bao bì đóng gói thực phẩm. Bần ổi là loài cây ngập mặn và có giá trị cao trong ngành y học, ẩm thực, kinh tế, phát triển ở các rừng ven biển, cửa sông và bãi bồi... chiết xuất từ lá bần ổi có hoạt tính chống ung thư biểu mô, ung thư phổi và ung thư vú ở người, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, đồng thời cũng có khả



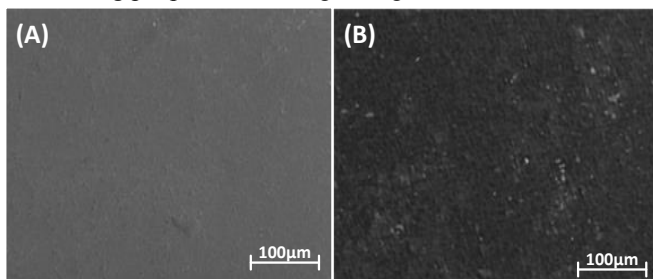
năng ức chế enzym Acetylcholinesterase. Một số các hợp chất của bản được phân loại thành 7 nhóm: Steroid, Triterpenoid, Flavonoid, Lignan, Megastigmane, polyphenolic và các nhóm hợp chất khác[7,8]. Những thành phần này có liên quan đến hoạt tính sinh học của chiết xuất bản, cho thấy khả năng kháng khuẩn chống lại các vi khuẩn gram dương (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*) và các khuẩn gram âm bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*)[9]. Như vậy, việc kết hợp chiết xuất SO vào màng chitosan là một bước đi mới để tạo ra màng sinh học có hoạt tính kháng khuẩn, được kì vọng sẽ đóng góp quan trọng cho khuynh hướng phát triển của màng thực phẩm hoạt tính.

2 Thực nghiệm

2.1 Hóa chất:

Chitosan chiết xuất từ vỏ tôm với độ Deacetyl hóa > 70% được mua từ Công ty trách nhiệm MTV Chitosan Việt Nam, bảo quản ở nơi thoáng mát, tránh ánh sáng, ẩm mốc. Lá bản ổi được sử dụng lá bản non trích li lấy dịch. Lá bản được thu hái trực tiếp tại huyện Cần Giờ, TP.HCM. Acid axetic (CH₃COOH), Glycerol được sản xuất bởi Công ty Xilong, Trung Quốc. Ethanol (CH₃CH₂OH, 99.7%), Nước cất được cung cấp bởi Công ty CHEMSOL, Việt Nam. Agar, Yeast extract, Peptone extract được cung cấp bởi Công ty HIMEDIA, Ấn Độ.

2.2 Phương pháp chế tạo màng kháng khuẩn:



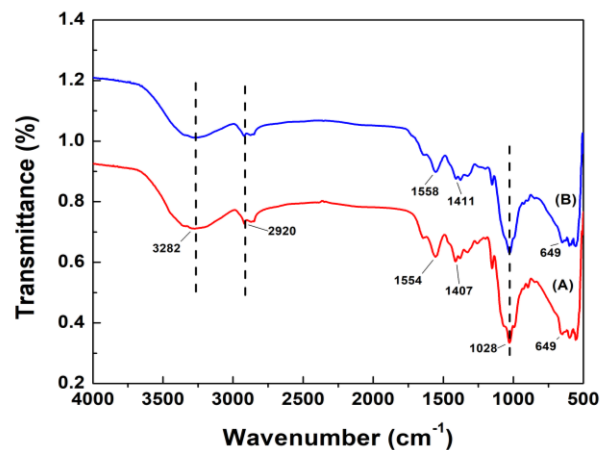
Hình 1 Ảnh SEM của màng CH-G (A), CH-G-SA1(B)

Chitosan 1% (w/v) được hòa tan bằng acid acetic 1% (w/v) và khuấy bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 24h. Sau khi chitosan hòa tan hoàn toàn, thêm Glycerol 30% vào làm chất hóa dẻo và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Sau đó, chiết xuất SO được thêm vào dung dịch polymer để đạt

nồng độ cuối cùng là 1% (w/v dung dịch màng). Dung dịch màng được rót vào đĩa petrix nhựa đường kính 90mm và sấy khô ở 40°C trong 48 giờ. Màng khô được tách khỏi khuôn và bảo quản tránh ánh sáng ở 25°C và 50% độ ẩm tương đối cho đến khi đánh giá.

2.3 Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan:

Phương pháp: sử dụng môi trường thạch lỏng. Cắt miếng màng có kích thước 1x2cm đặt vào ống nghiệm có chứa 2ml môi trường. Sau đó, thêm 0,5% dịch khuẩn (*E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. Aeginosa*, *S. subtilis*) đã nuôi cấy 12 giờ vào ống nghiệm. Ống nghiệm được ủ ở nhiệt độ phòng. Lấy mẫu theo thời gian (0 giờ, 6 giờ, 24 giờ) rồi cấy gạt trên đĩa thạch LB để xác định số lượng vi khuẩn có trong dịch nuôi cấy. Mẫu đối chứng được chuẩn bị chứa màng không có cao chiết. Cách tính CFU/ml như sau:



Hình 2 Ảnh FTIR của màng CH-G (A), CH-G-SA1(B)

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1Vf_1 + \dots + n_iVf_i}$$

Trong đó:

A: số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

n_i: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i: độ pha loãng tương ứng.

2.4 Phân tích thống kê:

Mỗi thí nghiệm sẽ được lặp lại 3 lần. Phân tích các biến để so sánh các giá trị có nghĩa của các yếu tố với mức ý nghĩa là 5%.

Bảng 1: Bảng kết quả định lượng kháng khuẩn của màng CH-G, CH-G-SA1.

Loại vi khuẩn	Cấu trúc màng	Số lượng colonies (CFU/ml)		
		0 h	6 h	24 h
<i>Salmonella Typhimurium</i>	CH-G	1.1x10 ¹¹	+++++	+++++
	CH-G-SA1	11x10 ¹¹	2x10 ¹¹	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CH-G	16.1x10 ¹¹	57.6x10 ¹¹	+++++
	CH-G-SA1	13x10 ¹¹	-	-

(+++++): không ức chế, (-): ức chế hoàn toàn

4 Kết quả và thảo luận

Phân tích kính hiển vi điện tử quét (SEM):

Theo kết quả phân tích SEM, bề mặt màng chitosan kết hợp với chiết trở nên tối màu hơn so với màng chitosan tinh khiết. Tuy nhiên, bề mặt của màng đều đồng nhất cho thấy sự kết hợp tốt, nhưng màng có chiết cho thấy bề mặt gồ ghề

hơn có thể cho rằng có sự xuất hiện của cao chiết bản ôi. Ảnh thực của màng chiết cũng cho thấy màng chitosan nguyên chất trắng và trong hơn so với màng có chiết nhưng màng có chiết vẫn giữ được sáng bóng và không có vết nứt gãy trên màng. Điều này cho thấy màng có sự tương hợp giữa chitosan và chiết xuất bản ôi.

Phân tích quang phổ hồng ngoại:

Bảng 2: Kết quả khả năng bảo quản của màng CH-G, CH-G-SA1.

Tính chất	Không phủ màng	Chitosan	Chitosan + chiết xuất
Ngày 0	Tươi	Tươi	Tươi
Ngày 1	Tươi	Tươi	Tươi
Ngày 2	Hơi héo	Tươi	Tươi
Ngày 3	Héo, đốm đen	Hơi héo	Hơi héo
Ngày 4	Nhiều đốm đen, hư	Đốm đen	Hơi héo
Ngày 6	Nhiều đốm đen, thối	Đốm đen, hư	Đốm đen

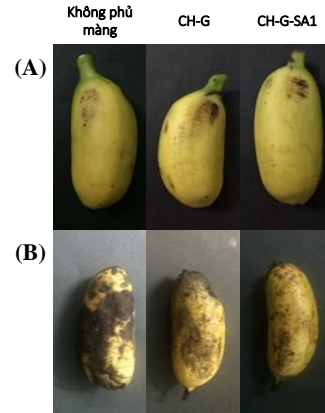
Quang phổ hồng ngoại của màng chitosan và màng chitosan kết hợp chiết xuất SO được thể hiện như Hình 2. Màng chitosan không biến tính thể hiện các đỉnh đặc trưng tại vùng số sóng 3282cm^{-1} (dao động giãn dài của nhóm hydroxyl tự do và nhóm $-\text{NH}$), 2920cm^{-1} (dao động của nhóm $-\text{CH}_2$), 1554cm^{-1} (nhóm amide II của chuỗi carbon chitosan), 1407cm^{-1} (nhóm amide III của chuỗi carbon chitosan) và dao động giãn dài C-O (1028cm^{-1})[10–12]. Khi bổ sung chiết xuất từ lá bản ôi vào màng chitosan, các mẫu màng đều thể hiện đặc tính đặc trưng của màng chitosan không biến tính. Tuy nhiên, nồng độ chiết xuất thêm vào tương đối ít do đó không quan sát rõ các đỉnh dao động của các liên kết có trong hợp chất Polyphenol. Khi hàm lượng chiết xuất thêm vào cao dẫn đến giảm cường độ dao động của các liên kết có trong màng chitosan không biến tính. Sự hiện diện của Polyphenol có trong màng được quan sát thông qua sự dịch chuyển bước sóng dao động của các liên kết O-H và N-H do có sự tương tác giữa các nhóm chức trên Polyphenol với các nhóm chức trên Chitosan[13]. Tuy nhiên, sự dịch chuyển này không đáng kể, không có sự khác biệt lớn trong phổ FTIR khi kết hợp chiết xuất bản ôi vào màng chitosan.

Khả năng kháng khuẩn của màng chitosan:

Hai vi khuẩn *Salmonella Typhimurium* và *Pseudomonas aeruginosa* đại diện cho vi khuẩn gram âm và gram dương để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan kết hợp với chiết xuất bản ôi. Kết quả được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc được ghi nhận ở 0, 6 và 24 giờ tiếp xúc được thể hiện trong Bảng 1. Trong khi khả năng kháng khuẩn của màng chitosan nguyên chất kém thì việc kết hợp với chiết xuất bản ôi đã cải thiện rõ ràng khả năng kháng khuẩn của màng chitosan. Ở thời điểm 6 giờ kết quả màng có chiết cho thấy số lượng khuẩn giảm và ở thời điểm 24 giờ bị ức chế hoàn toàn. Những kết quả này cho thấy chiết xuất SO được kết hợp vào trong màng chitosan có thể trở thành vật liệu bao gói thực phẩm tuyệt vời cho bảo vệ chống lại những vi khuẩn gây bệnh.

Ứng dụng bảo quản trái cây:

Về cảm quan của chuối sau khi phủ màng chitosan được thực hiện ở nhiệt độ phòng 29°C trong vòng 6 ngày khảo sát được trình bày trong Bảng 2.



Hình 3 Ảnh bảo quản trái chuối

(A) trước khi bảo quản, (B) bảo quản sau 6 ngày.

Sau 6 ngày bảo quản, tính chất cảm quan của chuối ngày càng xấu đi. Mẫu chuối không phủ màng, sau 6 ngày đã hư hỏng, thối hoàn toàn. Mẫu chuối phủ màng chitosan bắt đầu bị vi khuẩn xâm nhập, xuất hiện các đốm đen, hư hỏng một phần. Tuy nhiên, mẫu chuối có bổ sung thêm chiết xuất SO thì sau 6 ngày, lớp vỏ vẫn giữ được độ bóng, bắt đầu xuất hiện các đốm đen, không có tình trạng hư hỏng nào được quan sát.

5 Kết luận

Màng kháng khuẩn từ chitosan trong nghiên cứu này được tổng hợp thành công bằng việc kết hợp trực tiếp chiết xuất bản ôi. Ở nồng độ 1% cho thấy sự phân tán đồng đều của chiết trong màng chitosan, xem như một nguồn polyphenolic và flavonoid tự nhiên kết hợp với mạch chitosan. Khả năng kháng khuẩn chống lại *Salmonella Typhimurium* và *Pseudomonas aeruginosa* được tìm thấy trong màng chitosan. Để chứng minh cho khả năng kháng khuẩn tốt nên các thí nghiệm bảo quản trái cây cũng được

thực hiện và cho thấy khả năng bảo quản trái cây tuyệt vời của màng chitosan khi kết hợp với chiết xuất bần ôi. Những kết quả thu được cho thấy rằng màng chitosan kết hợp với chiết xuất bần ôi là vật liệu tiềm năng với hoạt tính kháng khuẩn cao trong bảo quản thực phẩm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số 2019.01.36/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. F. Shahidi and R. Abuzaytoun, "Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects," 2005, pp. 93–135.
2. T. Kean and M. Thanou, "Chapter 10. Chitin and Chitosan: Sources, Production and Medical Applications," pp. 292–318.
3. E. I. Rabea, M. E.-T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smaghe, and W. Steurbaut, "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457–1465, Nov. 2003.
4. P.-J. Chien, F. Sheu, and F.-H. Yang, "Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit," *Journal of Food Engineering*, vol. 78, no. 1, pp. 225–229, Jan. 2007.
5. N. Suseno, E. Savitri, L. Sapei, and K. S. Padmawijaya, "Improving Shelf-life of Cavendish Banana Using Chitosan Edible Coating," *Procedia Chemistry*, vol. 9, pp. 113–120, 2014.
6. J. M. Vieira, M. L. Flores-López, D. J. de Rodríguez, M. C. Sousa, A. A. Vicente, and J. T. Martins, "Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 116, pp. 88–97, Jun. 2016.
7. S. Saad, M. Taher, D. Susanti, H. Qaralleh, and A. F. I. B. Awang, "In vitro antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, no. 6, pp. 427–429, 2012.
8. "10-2012-In vitro antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*.pdf" .
9. S. Thomas and J. Kearsley, "Betel quid and oral cancer: A review," *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*, vol. 29, no. 4, pp. 251–255, 1993.
10. J. F. Rubilar, R. M. S. Cruz, H. D. Silva, A. A. Vicente, I. Khmelinskii, and M. C. Vieira, "Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract," *Journal of Food Engineering*, vol. 115, no. 4, pp. 466–474, Apr. 2013.
11. V. G. L. Souza, A. L. Fernando, J. R. A. Pires, P. F. Rodrigues, A. A. S. Lopes, and F. M. B. Fernandes, "Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants," *Industrial Crops and Products*, vol. 107, pp. 565–572, Nov. 2017.
12. M. H. Hosseini, S. H. Razavi, and M. A. Mousavi, "Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils," *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 33, no. 6, pp. 727–743, Dec. 2009.
13. E. Talón *et al.*, "Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts," *Carbohydrate Polymers*, vol. 157, pp. 1153–1161, Feb. 2017.

Study on the antibacterial activity of chitosan film incorporated with *Sonneratia ovata* leaf extract

Hoang Ngoc Bich*, Dao Thi To Uyen, Nguyen Thi Thuong

Nguyen Tat Thanh Institute of Hi-Technology, Nguyen Tat Thanh University

*hnbich@ntt.edu.vn

Abstract Chitosan films incorporated with *Sonneratia ovata* (SO) leaf extract were successfully prepared through a simple mixing method. The results obtained by Scanning Electron Microscope (SEM) analyses showed homogeneous film surface without fracture. The formation of hydrogen interaction between active compounds of SO extract and active NH₂ groups of chitosan was evidenced by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses. Besides, 1% of SO concentration (w/v), when incorporated, could improve the antibacterial activity of the chitosan film via inhibitory effects against two pathogenic bacteria, namely *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* after 24 hour exposure. The obtained results show the promising potential of chitosan film incorporated with *Sonneratia ovata* leaf extract for food packaging application.

Keywords Chitosan; Antibacterial Membranes; *Sonneratia ovata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*.

