

Xác định hoạt tính sinh học của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam Determination of Biological Activity of Mixture Lime and Orange Peel Oils

Nguyễn Văn Lợi^{1,*}, Lê Thị Phượng²

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, Minh Khai, Bắc Từ Liêm, Hà Nội

²Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

Đến Tòa soạn: 14-3-2016; chấp nhận đăng: 20-12-2016

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này đã xác định khả năng kháng vi khuẩn của tinh dầu vỏ quả chanh (TDA), tinh dầu vỏ quả cam (TDB) và hỗn hợp hai loại tinh dầu này trên hai nhóm vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* và Gram dương *Staphylococcus aureus*. Cả hai loại tinh dầu đều thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển của chủng *Escherichia coli* với đường kính vòng tròn kháng khuẩn là $39 \pm 2,8$ mm (tinh dầu vỏ quả chanh) và $32 \pm 1,5$ mm (tinh dầu vỏ quả cam). Với chủng *Staphylococcus aureus*, đường kính vòng tròn kháng khuẩn $43 \pm 3,5$ mm (tinh dầu vỏ quả chanh) và $37 \pm 1,4$ mm (tinh dầu vỏ quả cam). Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu vỏ quả chanh trên cả hai chủng là $6,25 \mu\text{l/ml}$; tinh dầu vỏ quả cam trên chủng *Escherichia coli*: $6,25 \mu\text{l/ml}$ và chủng *Staphylococcus aureus*: $3,35 \mu\text{l/ml}$. Với thể tích tinh dầu vỏ quả chanh sử dụng (0,1- 0,2 $\mu\text{l/ml}$) và tinh dầu vỏ quả cam (0,8-1,6 $\mu\text{l/ml}$) cho kết quả cộng hưởng mạnh nhất ($\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$) trên cả hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. Bằng phương pháp DPPH đã xác định được khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam là $45,56 \pm 0,25\%$.

Từ khóa: Hoạt tính sinh học, Hỗn hợp, Tinh dầu vỏ quả chanh, Tinh dầu vỏ quả cam

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of oils against food-related bacteria gram negative *Escherichia coli* and gram positive *Staphylococcus aureus* by using lime, orange peel oils in individual and in mixture. Both tested oils showed effective inhibition against *Escherichia coli* with inhibition zones of 39 ± 2.8 mm (lime peel oil) and of 32 ± 1.5 mm (orange peel oil). They also inhibited *Staphylococcus aureus* with inhibition zones of 43 ± 3.5 mm (lime peel oil) and of 37 ± 1.4 mm (orange peel oil). The minimum inhibitory concentrations (MIC) of lime peel oil against both tested strains were $6.25 \mu\text{l/ml}$; orange peel oil on a strains of *Escherichia coli*: $6.25 \mu\text{l/ml}$ and *Staphylococcus aureus*: $3.35 \mu\text{l/ml}$. With volume of lime peel oil used (0.1- 0.2 $\mu\text{l/ml}$) and orange peel oil (0.8-1.6 $\mu\text{l/ml}$) for maximum resonance results ($\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$) on both strains of *Staphylococcus aureus* and of *Escherichia coli*. The antioxidant activity was determined by using DPPH and it was $45.56 \pm 0.25\%$.

Keywords: Biological activity, Mixtures, Lime peel oil, Orange peel oil.

1. Mở đầu

Tinh dầu được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm... không chỉ nhờ mùi thơm đặc trưng hấp dẫn mà còn nhờ vào khả năng ức chế vi khuẩn của một số cấu tử có trong tinh dầu. Tinh dầu vỏ quả chanh và cam, có mùi thơm hấp dẫn, trong hai loại tinh dầu này có chứa các cấu tử tạo mùi thơm đặc trưng thuộc nhóm terpenoid. Các cấu tử tạo mùi thơm đặc trưng trong tinh dầu vỏ quả cam sành Hàm Yên (octanal, nonanal, citronellal, decanal, geranial) và trong tinh dầu vỏ quả chanh giấy Hàm Yên (octanal, citronellal, decanal, dodecanal, geranial, tridecanal) [1], [2]. Trong terpenoid có các cấu tử thuộc nhóm chức andehit, ancol, este có vai trò quan trọng trong

việc tạo mùi thơm đặc trưng cho tinh dầu vỏ quả chanh và cam. Các cấu tử tạo mùi thơm đặc trưng thuộc nhóm chức andehit, ancol, este có khả năng kháng khuẩn mạnh trên các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và *Bacillus cereus* [1], [2]. Hiện nay trên thế giới cũng như trong nước đã có nhiều công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của tinh dầu và bổ sung tinh dầu vào thực phẩm. Tuy nhiên các công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam thì còn rất khiêm tốn. Trong nghiên cứu này đã xác định được khả năng kháng khuẩn của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam trên hai nhóm vi khuẩn gram âm *Escherichia coli* và gram dương *Staphylococcus aureus*, đồng thời cũng đã xác định được hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu này, làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng tinh dầu vào trong thực phẩm.

* Địa chỉ liên hệ: Tel: (+84) 986592378

Email: loichebien@yahoo.com

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Quả chanh giấy Bắc Giang (*Citrus limonia* Osbeck) được thu hoạch ở thời điểm 130 ngày kể từ khi đậu quả (vào tháng 5 năm 2015) và quả cam sành Hàm Yên (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) được thu hoạch ở thời điểm 220 ngày kể từ khi đậu quả (vào tháng 12 năm 2014). Tên khoa học được Th.S. Vũ Kiều Sâm, Trường Đại học Nông lâm Bắc Giang giám định. Tinh dầu vỏ quả chanh giấy Bắc Giang và cam sành Hàm Yên được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và được làm khan bằng natrisunfat.

Thí nghiệm sử dụng các chủng vi sinh vật kiểm chứng *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* do Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học cung cấp.

Hóa chất sử dụng là DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ethyl acetat, methanol và vitamin E.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Khả năng ức chế của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam đối với sự phát triển của từng chủng vi sinh vật được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường thích hợp. Các đĩa giấy lọc tiệt trùng có chứa tinh dầu được đặt lên trên đĩa thạch đã cấy chủng vi khuẩn kiểm chứng, vi khuẩn này được nuôi cấy ở 37°C với thời gian 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi khuẩn bằng công thức: $D - d = BK$ (mm), với D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d: đường kính lỗ khoan thạch (mm) [3], [4].

2.2.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của hỗn hợp tinh dầu

Nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration, MIC) của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục trong môi trường lỏng sử dụng phen 96 giếng [4]. Hỗn hợp tinh dầu với nồng độ thử nghiệm khác nhau được hòa tan trong nước cất vô trùng có chứa Tween 80. Mỗi giếng trong phen chứa 20 μ l tinh dầu, 20 μ l dịch vi khuẩn và 160 μ l môi trường MHB (nồng độ cuối cùng của dịch vi khuẩn là 10^6 cfu/ml và thể tích cuối cùng là 200 μ l). Phen 96 giếng được đem đi nuôi cấy trong thời gian 24 giờ ở 37°C. Nồng độ vi khuẩn nhỏ nhất mà không quan sát được sự phát triển của vi khuẩn bằng máy đọc vi hiển kính tại bước sóng hấp thụ 600 nm được ghi nhận là nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu [3], [5].

2.2.3. Phương pháp xác định sự tương tác giữa hai loại tinh dầu

Sau khi xác định được nồng độ ức chế tối thiểu MIC của từng loại tinh dầu riêng biệt, tiến hành kiểm tra sự tương tác, tác dụng tương hợp và ảnh hưởng của các loại tinh dầu với nhau bằng phương pháp pha loãng liên tục hỗn hợp hai loại tinh dầu trong môi trường lỏng sử dụng phen 96 giếng [4]. Khả năng sống sót của vi khuẩn kiểm chứng khi sử dụng hỗn hợp của 2 loại tinh dầu vỏ quả chanh và cam với nồng độ tương ứng 1xMIC và 1xMIC hoặc 1/2 MIC và 1/2MIC; 1/4MIC và 1/4MIC; 1/8MIC và 1/8MIC... Nồng độ ức chế riêng phần (Fractional Inhibitory Concentration: FIC) xác định được khả năng tương tác của tinh dầu vỏ quả chanh và tinh dầu vỏ quả cam thể hiện qua giá trị FIC được tính theo công thức: $FIC_{TDA} = MIC_{TDA}$ khi sử dụng hỗn hợp hai loại tinh dầu / MIC_{TDA} khi sử dụng riêng rẽ

$$\sum FIC = FIC_{TDA} + FIC_{TDB}$$

Trong đó $\sum FIC \leq 0,5$ là tương tác cộng hưởng; $0,5 < \sum FIC \leq 1,0$ là tương tác bổ sung; $1,0 < \sum FIC \leq 4,0$ là không tương tác; $4 < \sum FIC$ thể hiện tương tác đối kháng [3].

2.2.4. Phương pháp xác định khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu

Khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam được thực hiện theo phương pháp DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) như sau: Mẫu thí nghiệm gồm 0,1 ml hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam, 2ml ethyl acetat, 1,9ml methanol và 1ml DPPH. Mẫu trắng gồm 0,1ml hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam, 2ml ethyl acetat và 2,9ml methanol. Mẫu kiểm chứng gồm 2ml ethyl acetat, 2ml methanol và 1ml DPPH. Hỗn hợp sau khi phối trộn lắc nhẹ và để yên trong bóng tối ở nhiệt độ phòng 30 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517nm [6], [7]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính bằng công thức %DPPH = $[(A_0 - (A - A_b)) / A_0] \times 100$ %, trong đó DPPH: hoạt tính quét gốc tự do (%), A_0 : độ hấp thụ của mẫu kiểm chứng, A: độ hấp thụ của mẫu thí nghiệm, A_b : độ hấp thụ của mẫu trắng.

Khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam được so sánh đối chứng với vitamin E.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả chanh và cam

Khả năng kháng khuẩn của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 1 cho thấy tinh dầu vỏ quả chanh và tinh dầu vỏ quả cam đều có khả năng kháng khuẩn mạnh trên các chủng vi sinh vật

kiểm chứng. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả chanh, với đường kính vòng tròn kháng khuẩn của chủng *Escherichia coli* là $39 \pm 2,8$ mm và chủng *Staphylococcus aureus* là $43 \pm 3,5$ mm. Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu vỏ quả chanh trên cả hai chủng vi khuẩn này là $6,25\mu\text{l/ml}$. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả cam, với đường kính vòng tròn kháng khuẩn của chủng *Escherichia coli* là $32 \pm 1,5$ mm, nồng độ ức chế tối thiểu $6,25\mu\text{l/ml}$, chủng *Staphylococcus aureus* là $37 \pm 1,4$ mm và nồng độ ức chế tối thiểu $3,35\mu\text{l/ml}$.

Bảng 1. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả chanh và cam

Tinh dầu	Đường kính vòng tròn kháng khuẩn* (mm)		Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ** ($\mu\text{l/ml}$)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TDA	$39 \pm 2,8$	$43 \pm 3,5$	6,25	6,25
TDB	$32 \pm 1,5$	$37 \pm 1,4$	6,25	3,35

TDA: Tinh dầu vỏ quả chanh, TDB: Tinh dầu vỏ quả cam

*đường kính vòng tròn kháng khuẩn thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn (≥ 6 mm: có khả năng kháng khuẩn).

** Nồng độ ức chế tối thiểu là giá trị trung bình của ít nhất ba lần thí nghiệm lặp lại.

Bảng 2. Nồng độ ức chế riêng phần của tinh dầu vỏ quả chanh và cam với chủng *Escherichia coli*

Các giá trị	1MIC _{TDB} ** ($6,25\mu\text{l/ml}$)	1/2MIC _{TDB} ($3,13\mu\text{l/ml}$)	1/4MIC _{TDB} ($1,6\mu\text{l/ml}$)	1/8MIC _{TDB} ($0,8\mu\text{l/ml}$)
1MIC _{TDA} ($6,25\mu\text{l/ml}$)	2,30	1,50	1,35	1,15
1/2MIC _{TDA} ($3,13\mu\text{l/ml}$)	1,60	1,10	0,85	0,68
1/4MIC _{TDA} ($1,6\mu\text{l/ml}$)	1,35	0,85	0,80	0,41
1/8MIC _{TDA} ($0,8\mu\text{l/ml}$)	1,15	0,65	0,41	0,35

3.2. Khả năng kháng khuẩn khi sử dụng hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam

Tác dụng cộng hưởng, khi sử dụng hỗn hợp hai loại tinh dầu vỏ quả chanh và cam ở các nồng độ khác nhau được đánh giá bởi chỉ số FIC, nồng độ ức chế riêng phần được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục hỗn hợp hai loại tinh dầu này trong môi trường lỏng sử dụng phen 96 giếng. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và bảng 3.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 2 và bảng 3 cho thấy, ở nồng độ 1/8 đến 1/4 MIC với mỗi loại tinh

dầu sử dụng ($0,10- 0,20\mu\text{l/ml}$ với tinh dầu vỏ quả chanh và từ $0,80-1,60\mu\text{l/ml}$ với tinh dầu vỏ quả cam) sẽ cho kết quả cộng hưởng mạnh nhất ($\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$). Như vậy việc sử dụng hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam có khả năng kháng khuẩn mạnh trên chủng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* hơn là khi sử dụng riêng rẽ từng loại tinh dầu. Điều đó có ý nghĩa quan trọng trong việc bổ sung hỗn hợp tinh dầu này vào thực phẩm; vừa có tác dụng tạo mùi thơm cho thực phẩm, có tác dụng kháng khuẩn và bảo quản thực phẩm.

Bảng 3. Nồng độ ức chế riêng phần của tinh dầu vỏ quả chanh và cam với chủng *Staphylococcus aureus*.

Các giá trị	1MIC _{TDB} ** ($6,25\mu\text{l/ml}$)	1/2MIC _{TDB} ($3,13\mu\text{l/ml}$)	1/4MIC _{TDB} ($1,6\mu\text{l/ml}$)	1/8MIC _{TDB} ($0,8\mu\text{l/ml}$)
1MIC _{TDA} ($0,8\mu\text{l/ml}$)	2,51	1,54	1,34	1,16
1/2MIC _{TDA} ($0,39\mu\text{l/ml}$)	1,64	1,15	0,83	0,65
1/4MIC _{TDA} ($0,2\mu\text{l/ml}$)	1,46	0,92	0,64	0,58
1/8MIC _{TDA} ($0,1\mu\text{l/ml}$)	1,15	0,71	0,45	0,36

**MIC: nồng độ ức chế tối thiểu, $\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$: Cộng hưởng, $0,5 < \Sigma\text{FIC} \leq 1,0$: cộng hợp, $1,0 < \Sigma\text{FIC} \leq 4,0$: không tương tác, $4,0 < \Sigma\text{FIC}$: đối kháng.

Bảng 4. Khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam

Mẫu thí nghiệm	Thể tích (ml)	% quét gốc tự do DPPH
TDA	0,10	$41,25 \pm 0,12$
TDB	0,10	$38,17 \pm 0,24$
Hỗn hợp TDA và TDB	0,10	$45,56 \pm 0,25$
Vitamin E	0,10	$43,38 \pm 0,17$

3.3. Khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam

Khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam được xác định theo phương pháp quét gốc tự do DPPH, thí nghiệm được tiến hành tại Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 4 cho thấy hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam có khả năng chống oxy hóa lớn hơn tinh dầu vỏ quả chanh và cam khi sử dụng riêng rẽ. Tinh dầu vỏ quả chanh và cam khi sử dụng riêng rẽ, khả năng chống oxy hóa nhỏ hơn vitamin E, nhưng khi sử dụng kết hợp hai

loại tinh dầu này thì khả năng chống oxy hóa lại lớn hơn so với vitamin E.

4. Kết luận

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả chanh, với đường kính vòng tròn kháng khuẩn của chủng *Escherichia coli* là $39 \pm 2,8$ mm và chủng *Staphylococcus aureus* là $43 \pm 3,5$ mm. Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu vỏ quả chanh trên cả hai chủng vi khuẩn này là $6,25\mu\text{l/ml}$. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ quả cam, với đường kính vòng tròn kháng khuẩn của chủng *Escherichia coli* là $32 \pm 1,5$ mm, nồng độ ức chế tối thiểu $6,25\mu\text{l/ml}$, chủng *Staphylococcus aureus* là $37 \pm 1,4$ mm và nồng độ ức chế tối thiểu $3,35\mu\text{l/ml}$. Với thể tích tinh dầu vỏ quả chanh sử dụng ($0,1-0,2\mu\text{l/ml}$) và tinh dầu vỏ quả cam ($0,8-1,6\mu\text{l/ml}$) cho kết quả cộng hưởng mạnh nhất ($\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$) trên cả hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. Bằng phương pháp DPPH đã xác định được khả năng chống oxy hóa của hỗn hợp tinh dầu vỏ quả chanh và cam là $45,56 \pm 0,25\%$.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Thị Minh Tú, Hoàng Đình Hòa. Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của các thành phần tạo hương trong tinh dầu vỏ quả bưởi và vỏ quả cam của Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 51(2) (2013) 153- 162.
- [2]. Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Thị Minh Tú, Hoàng Đình Hòa. Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của các cấu tử tạo hương trong tinh dầu vỏ quả chanh giấy Hàm Yên- Tuyên Quang. Tạp chí Hóa học, tập 51(4) (2013) 519- 523.
- [3]. Vũ Thu Trang, Lâm Xuân Thanh, Samira Sarter. Nghiên cứu hoạt tính kháng vi khuẩn khi sử dụng kết hợp tinh dầu quế và màng tang. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 52 (5B) (2014) 417-422.
- [4]. Gutierrez J., Barry-Ryan C., and Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124 (2008) 91-97.
- [5]. Fei L., Liang H., Yuan Q. and Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International 44 (2011) 3057-3064.
- [6]. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarc Journal of Science Technology 26, (2004) 211- 219.
- [7]. Matook S.M and Fumio H. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. Food Chemistry 94 (2006) 529-534.