

Hoạt tính và tương tác kháng khuẩn của tinh dầu quả măng tang và chitosan đối với vi khuẩn gây bệnh thực phẩm

Antibacterial Activity and Interaction Effects of *Litsea Cubeba* Fruit Essential Oil and Chitosan Against Food-Borne Bacteria

Nguyễn Hải Vân*, Phan Thanh Tâm, Chu Kỳ Sơn, Nguyễn Thị Thu Trang

Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

*Email: van.nguyenhai@hust.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu nhằm đánh giá tương tác kháng khuẩn của tinh dầu (TD) quả măng tang (MT) *Litsea cubeba* và chitosan (CTS) với vi khuẩn gây bệnh thực phẩm. Đường kính vòng kháng khuẩn của TD, CTS và phức TD-CTS với *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC13061 dao động từ 39,0 - 57,3 mm; 11,7 - 15,5 mm và 29,7 - 39,3 mm. Nồng độ ức chế tối thiểu của TDMT và CTS với vi khuẩn tương ứng là 5,53 mg/mL và từ 0,60 - 0,80 mg/mL. Tương tác cộng hợp thể hiện khi kết hợp TDMT và CTS với tổng nồng độ ức chế riêng phần dao động từ 0,62 - 0,67. Nồng độ ức chế tối thiểu của TDMT và CTS trong hỗn hợp tương ứng giảm 6 - 8 lần và 2 lần so với khi dùng riêng lẻ. Kết quả đã chứng minh tiềm năng ứng dụng của phức TD-CTS trong bảo quản thực phẩm.

Từ khóa: chitosan, kháng khuẩn, *Litsea cubeba*, tương tác kháng khuẩn

Abstract

The aims of this study were to investigate the antibacterial activity and interaction effect of *Litsea cubeba* fruit essential oil (EO) and chitosan (CTS) against food-borne bacteria. The inhibition zone of EO, CTS and EO-CTS mixture against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 13061 ranged from 39.0 - 57.3 mm; 11.7 - 15.5 mm and 29.7 - 39.3 mm, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of EO and CTS were 5.53 mg/mL and from 0.60 - 0.80 mg/mL, respectively. The synergistic effects were found when EO and CTS were used in combination with fractional inhibitory concentration values ranging from 0.62 - 0.67. The MIC of the EO and CTS combination was decreased from 6 to 8-fold and 2-fold compared to individual treatment by EO and CTS, respectively. The obtained results demonstrated the potential application of EO-CTS mixture in food preservation.

Keywords: chitosan, antibacterial activity, *Litsea cubeba*, interaction effect

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là một nước nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa nên có nguồn tài nguyên thực vật vô cùng phong phú. Tuy nhiên, hiện chỉ có khoảng 4.000 loài cây được sử dụng làm cây thuốc, với trên 300 loại cây tinh dầu (TD) được thu thập [1]. Măng tang, tên khoa học *Litsea cubeba*, thuộc chi Bời Lồi *Litsea* (Lauraceae) là một cây có thân màu xanh, cao từ 5-8m. Cây măng tang được phân bố rộng rãi ở khu vực cận nhiệt đới như Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan và Đông Nam Á. TD măng tang được khai thác nhiều nhất là từ quả do hàm lượng TD có mặt trong quả là lớn nhất (khoảng 8%) và nó được coi là nguồn cung cấp citral quan trọng (chiếm từ 70-90% TD quả) [2]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã báo cáo về đặc tính chống oxy hóa, chống vi khuẩn, chống viêm và chống nấm của TD măng tang [3,4].

Cũng chính từ những đặc tính sinh học này, TD đã bước đầu được ứng dụng như một chất phụ gia tự nhiên trong thực phẩm, được sử dụng một mình hoặc kết hợp cùng với phương pháp bảo quản khác và thay thế các chất bảo quản tổng hợp [5]. Tuy nhiên, cho đến nay, các dữ liệu khoa học về việc ứng dụng TD quả măng tang trong thực phẩm làm chất bảo quản là tương đối thấp. Ngoài ra, các chất màu cũng như các hợp chất thơm trong TD cũng có thể ảnh hưởng đến màu sắc và mùi vị của thực phẩm nếu sử dụng ở nồng độ cao [6]. Để giảm những tác dụng phụ không mong muốn của TD cũng như tăng cường hoạt tính kháng khuẩn của chúng, một số nghiên cứu đã tiến hành kết hợp TD với các chất kháng khuẩn khác. TD hạt thì và TD khuynh diệp khi kết hợp với chitosan (CTS) có hiệu ứng tương tác khác nhau, có khả năng kháng lại một số vi khuẩn gây bệnh thực phẩm [7].

CTS là sản phẩm deacetyl hóa chitin, trong đó nhóm (-NH₂) thay thế nhóm (-COCH₃) ở vị trí C(2). CTS có khả năng tích điện dương do đó nó có khả năng kết hợp với những chất tích điện âm như chất béo, lipid và axit mật. Với đặc tính có thể hoà tan tốt trong môi trường axit, CTS được chú ý đặc biệt như là một loại vật liệu mới và được chứng minh có tiềm năng lớn trong công nghiệp do khả năng phân huỷ sinh học, không độc hại, chống oxy hoá, kháng nấm, kháng khuẩn cũng như tính thấm oxy thấp [8].

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của TD quả màng tang *L. cubeba* và CTS khi sử dụng riêng lẻ và kết hợp chống lại một số vi khuẩn gây bệnh thực phẩm như *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus cereus*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

CTS được lấy từ khoa Công nghệ Thực phẩm, Đại học Nông lâm Thái Nguyên. Bột CTS sử dụng trong nghiên cứu có độ deacetyl hoá 93% và có độ nhớt 50 cps. Bột CTS được hoà tan và pha loãng trong dung dịch đệm axetat pH 4,5. Các nồng độ khác nhau của CTS được chuẩn bị để xác định khả năng kháng khuẩn.

TD quả màng tang *L. cubeba* được chiết xuất bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước tại Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, có độ tinh khiết > 98%. TD thu được giữ trong bình tối màu kín ở 4 °C đến khi sử dụng.

Nghiên cứu sử dụng 2 chủng vi khuẩn Gram dương *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 13061 và 2 chủng vi khuẩn Gram âm *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 được lấy từ bộ sưu tập chủng giống Hoa Kỳ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hoạt tính kháng khuẩn của TD màng tang và CTS được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [9] và phương pháp pha loãng liên tục [4]. Các chủng vi khuẩn kiểm nghiệm sau khi hoạt hoá ở 37 °C trong 24 giờ trong môi trường Muller Hilton Broth (Merck), được pha loãng về nồng độ 10⁸ CFU/mL (OD = 0,1 ở bước sóng 600 nm) và dịch huyền phù vi khuẩn mật độ 10⁶ CFU/mL được chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.1. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Đối với phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, 100 µL dịch vi khuẩn được cấy đều trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường Muller Hilton Agar (MHA, Merck). Nhỏ 10 µL TD lên đĩa giấy tiệt trùng đường kính 6mm hoặc nhỏ 100 µL dịch CTS vào lỗ thạch có đường kính 6mm. Các đĩa thạch sau đó được giữ ở 4 °C trong tủ lạnh để khuếch tán các chất kháng khuẩn trong 1 giờ [9]. Đường kính vòng kháng khuẩn được

đo sau 24 giờ nuôi ở 37 °C. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.2.2. Phương pháp pha loãng liên tục trên phiên 96 giếng

Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của TD và CTS được xác định theo phương pháp pha loãng liên tục trong môi trường MHB trên phiên 96 giếng [4]. TD được hoà tan trong nước cất tiệt trùng chứa 0,5% v/v Tween 80. Thực hiện pha loãng theo dãy nồng độ giảm dần sao cho nồng độ cuối cùng của TD và CTS trong các giếng tương ứng lần lượt là 44,35 - 0,35 mg/mL và 1,00 - 0,20 mg/mL. Mỗi giếng chứa tổng 200 µL dịch với chất kháng khuẩn ở các nồng độ khác nhau và dịch vi khuẩn ở nồng độ 10⁶ CFU/mL. Thực hiện song song các mẫu kiểm chứng dương (chứa MHB và dịch vi khuẩn tương ứng) và kiểm chứng âm (chứa MHB) ở cùng điều kiện. Sau khi nuôi lắc 24 giờ ở 37 °C, xác định giá trị MIC của chất kháng khuẩn. MIC là nồng độ thấp nhất của chất kháng khuẩn mà ở đó có thể ức chế sự phát triển nhìn thấy được của vi khuẩn [4].

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng cách cấy 100 µL dịch nuôi cấy từ các giếng MIC mà không nhìn thấy sự phát triển của vi khuẩn lên môi trường MHA, sau đó nuôi ở 37 °C trong 24 giờ. Giá trị MBC được xác định là nồng độ thấp nhất của chất kháng khuẩn mà ở đó ức chế hoàn toàn sự tăng trưởng của vi khuẩn (không có sự phát triển của vi khuẩn trên các đĩa thạch) [4]. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.3. Phương pháp xác định nồng độ ức chế riêng phần

Để xác định hiệu quả tương tác khi kết hợp hai chất kháng khuẩn, giá trị nồng độ ức chế riêng phần - FIC (Fractional Inhibitory Concentration) được xác định.

Bảng 1. Nồng độ tinh dầu và chitosan kết hợp cuối cùng trong mỗi giếng

	1MIC TD	1/2 MIC TD	1/4 MIC TD	1/6 MIC TD	1/8 MIC TD
1 MIC CTS	1 : 1	1/2 : 1	1/4 : 1	1/6 : 1	1/8 : 1
1/2 MIC CTS	1 : 1/2	1/2 : 1/2	1/4 : 1/2	1/6 : 1/2	1/8 : 1/2
1/4 MIC CTS	1 : 1/4	1/2 : 1/4	1/4 : 1/4	1/6 : 1/4	1/8 : 1/4
1/6 MIC CTS	1 : 1/6	1/2 : 1/6	1/4 : 1/6	1/6 : 1/6	1/8 : 1/6
1/8 MIC CTS	1 : 1/8	1/2 : 1/8	1/4 : 1/8	1/6 : 1/8	1/8 : 1/8

Giá trị FIC được tính theo công thức [10]:

$$\sum FIC = FIC_{TD} + FIC_{CTS}$$

trong đó: $FIC_{TD} = \frac{MIC(TD) \text{ kết hợp}}{MIC(TD) \text{ riêng phần}}$

$$FIC_{CTS} = \frac{MIC(CTS) \text{ kết hợp}}{MIC(CTS) \text{ riêng phần}}$$

$\sum FIC \leq 0,5$	Tương tác cộng hưởng
$0,5 \leq \sum FIC \leq 1$	Tương tác cộng hợp
$1 < \sum FIC \leq 4$	Không tương tác
$4 < \sum FIC$	Tương tác đối kháng

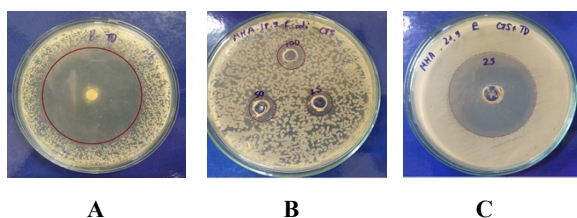
Một dãy các nồng độ khác nhau của TD và CTS được chuẩn bị, sao cho nồng độ cuối của hai chất kháng khuẩn trong giếng là 1 MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/6 MIC và 1/8 MIC. Trong phiên 96 giếng, TD ở các nồng độ khác nhau sẽ được bổ sung theo hàng dọc, trong khi đó CTS sẽ được bổ sung theo hàng ngang. Cuối cùng, trong mỗi giếng chứa tổng cộng 200 μ L dịch với nồng độ TD màng tang và CTS như Bảng 1 và vi khuẩn kiểm nghiệm ở nồng độ 10^6 CFU/mL [10]. Thực hiện song song các mẫu kiểm chứng âm (chứa MHB) và dương (chứa MHB và dịch vi khuẩn tương ứng) ở cùng điều kiện.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu, chitosan và phức hợp tinh dầu - chitosan

Hoạt tính kháng khuẩn của TD, CTS và phức hợp TD-CTS được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và phương pháp pha loãng liên tục.

Giá trị đường kính vòng kháng khuẩn của TD quả màng tang *L. cubeba*, CTS và hỗn hợp TD-CTS được thể hiện ở Bảng 2 và hình 1. Kết quả Bảng 2 cho thấy các chất kháng khuẩn đều có khả năng kháng lại cả vi khuẩn Gram (-) và Gram (+). Cụ thể, đường kính vòng kháng khuẩn của TD, CTS và hỗn hợp TD-CTS tương ứng đối với 4 chủng vi khuẩn kiểm định dao động từ 39,0 - 57,3 mm; 11,7 - 15,5 mm và 29,7 - 39,3 mm (Bảng 2). Khả năng kháng khuẩn của TD tốt nhất đối với *B. cereus* với $D = 57,3 \pm 0,6$ mm, trong khi đó CTS và hỗn hợp TD-CTS lại thể hiện khả năng kháng khuẩn lớn nhất đối với *S. typhimurium* và *S. aureus* với $D = 15,5 \pm 0,7$ mm và $D = 39,3 \pm 0,6$ mm. Trong đa số trường hợp, vi khuẩn Gram (+) nhạy cảm với chất kháng khuẩn hơn so với vi khuẩn Gram (-). Điều này có thể do sự khác biệt về cấu tạo màng tế bào vi khuẩn [11].



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của TD (hình 1A), CTS (hình 1B) và hỗn hợp TD-CTS (hình 1C) đối với *E. coli*

Các kết quả thu được trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trước đây. Islam và cs. báo cáo về khả năng kháng khuẩn của CTS ở nồng độ 400 - 1000 ppm đối với *E. coli* và *S. aureus*. Kết quả chỉ ra rằng đường kính vòng kháng khuẩn của CTS với

E. coli và *S. aureus* lần lượt là 8 - 10 mm và 10 - 13 mm [12]. Trong nghiên cứu này, đáng lưu ý là khi tăng gấp đôi nồng độ CTS thì không có sự thay đổi đáng kể về đường kính vòng kháng khuẩn (số liệu không trình bày). Điều này có thể giải thích do CTS có trọng lượng phân tử lớn nên nó có khả năng khuếch tán kém trong môi trường thạch [13].

Nghiên cứu của Hammid và Ahmad (2015) chứng minh TD quả màng tang có khả năng kháng *B. subtilis* và *S. aureus*, với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là $47,0 \pm 2,5$ mm và $29,0 \pm 1,4$ mm [14]. Hoạt tính kháng khuẩn khác nhau đã được báo cáo đối với từng bộ phận khác nhau của cây. Sự khác nhau về thành phần hoá học làm ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của TD. Điều kiện địa lý, bộ phận thu hái, thời điểm thu hái ... là những yếu tố có thể ảnh hưởng đến thành phần hoá học của TD [4].

Khi kết hợp TD và CTS, hoạt tính kháng khuẩn của hỗn hợp giảm đi so với TD và tăng lên so với CTS khi sử dụng riêng lẻ ở cùng nồng độ. Nguyên nhân xảy ra sự chênh lệch giữa đường kính vòng kháng khuẩn của TD màng tang là do khả năng khuếch tán của TD màng tang và CTS là khác nhau trong môi trường thạch. TD màng tang là hợp chất dễ bay hơi, thêm vào đó, trọng lượng phân tử của các chất trong TD màng tang nhỏ hơn đối với trọng lượng phân tử của chitosan. Chính vì vậy nên khả năng khuếch tán của TD, CTS và phức hợp TD-CTS khác nhau đối với các chủng kiểm nghiệm [13].

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của TD, CTS và hỗn hợp TD-CTS

	TD	CTS	TD-CTS
<i>E. coli</i>	$44,3 \pm 1,2^*$	$14,0 \pm 1,7$	$33,0 \pm 0$
<i>S. typhimurium</i>	$39,0 \pm 1,0$	$15,5 \pm 0,7$	$32,7 \pm 0,6$
<i>B. cereus</i>	$57,3 \pm 0,6$	$11,7 \pm 0,6$	$29,7 \pm 1,5$
<i>S. aureus</i>	$51,3 \pm 1,2$	$12,7 \pm 0,6$	$39,3 \pm 0,6$

Chú thích: TD: tinh dầu; CTS: chitosan; TD-CTS: hỗn hợp tinh dầu -chitosan, * đường kính vòng kháng khuẩn bao gồm cả đường kính khoanh giấy/lỗ thạch

Khả năng kháng khuẩn của TD và CTS còn được thể hiện thông qua giá trị MIC và MBC trong nghiên cứu này. Giá trị MIC và MBC càng thấp, hoạt tính kháng khuẩn của chất kháng khuẩn đối với vi sinh vật càng mạnh và ngược lại.

Giá trị MIC của TD màng tang đối với 4 chủng vi khuẩn kiểm nghiệm là 5,53 mg/mL, MBC dao động trong khoảng 7,37 - 22,12 mg/mL. Dựa vào giá trị MBC/MIC, TD màng tang có tác dụng diệt khuẩn đối với *E. coli*, *S. aureus* và *S. typhimurium*. Riêng đối với *B. cereus*, TD màng tang chỉ có tác dụng kim khuẩn với vi khuẩn này do chúng có khả năng tạo thành bào tử trong điều kiện bất lợi [15]. Đối với CTS, giá trị MIC và MBC của CTS lần lượt nằm trong khoảng từ 0,60 - 0,80 mg/mL và 0,80 - 1,00 mg/mL (Bảng 3).

CTS thể hiện khả năng diệt khuẩn đối với cả 4 chủng kiểm nghiệm.

Một số nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, TD màng tang có tác dụng kháng khuẩn mạnh đặc biệt trên các vi khuẩn gây hồng và gây bệnh thực phẩm thường gặp như *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*... Wang và Liu (2010) báo cáo khả năng kháng khuẩn của TD màng tang thu được từ các bộ phận khác nhau của cây, với đường kính vòng kháng khuẩn và MIC tương ứng là 10,1 - 35,0 mm và 100 - 1000 µg/mL đối với *B.subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *M. albicans*, *P. aeruginosa* và *S. aureus* [3]. Sự khác biệt này có thể là do sự khác nhau về thành phần hóa học của TD và chủng vi sinh vật thử nghiệm. Tác dụng kháng khuẩn của TD màng tang chủ yếu là do sự hiện diện của aldehyde chiếm đến 70% trong toàn bộ thành phần tinh dầu. Hoạt động kháng khuẩn của TD quả màng tang được chứng minh có liên quan đến thành phần hoá học chính có mặt trong TD, chủ yếu là citral. Citral dễ dàng bám lên thành tế bào của vi khuẩn dẫn đến sự thay đổi hình dạng vi khuẩn và tính lỏng màng tế bào. Lúc này, TD xâm nhập vào trong màng tế bào, tác động đến các chất nội bào như làm thay đổi hình thái của ADN, làm rò rỉ các chất nội bào, thay đổi cấu trúc tế bào ... và cuối cùng dẫn đến sự chết của tế bào [16].

TD màng tang được đánh giá có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và có thể gây chết vi sinh vật trong thời gian ngắn. Các nghiên cứu động học diệt khuẩn tinh dầu màng tang ở nồng độ MIC 0,0625% (v/v) có thể làm trễ và kéo dài giai đoạn tăng trưởng *E. coli* xấp xỉ 12 giờ trong khi đó ở nồng độ gây chết (MBC 0,125% v/v) TD có khả năng giết chết tế bào hoàn toàn [16].

CTS ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn như *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, ... Nồng độ ức chế sự phát triển của vi khuẩn thay đổi trong khoảng 10 - 16000 ppm [17]. Khả năng kháng khuẩn của CTS không chỉ phụ thuộc vào các điều kiện bên ngoài (vi sinh vật đích, pH, độ hòa tan,...), mà còn phụ thuộc vào các yếu tố bên trong (trọng lượng phân tử, mức độ polyme hóa, mức độ diacetyl hóa) [18]. CTS có khối lượng phân tử thấp có khả năng kháng khuẩn cao hơn so với CTS có khối lượng phân tử cao do CTS có khối lượng phân tử thấp có khả năng tan trong nước cao hơn dẫn đến phản ứng tốt hơn với các vị trí hoạt động của vi sinh vật. Đồng thời, hoạt tính kháng khuẩn của CTS tỷ lệ thuận với độ deacetyl hoá của CTS. Mức độ deacetyl hóa cao có nghĩa là số lượng các nhóm amin trên CTS tăng lên, làm tăng khả năng hòa tan CTS và tăng mật độ điện tích do đó cải thiện độ bám dính của CTS lên các tế bào vi sinh vật [18].

Cơ chế kháng khuẩn của CTS có thể giải thích là do sự tương tác tĩnh điện giữa điện tích dương của nhóm amin (NH_3^+) ở giá trị pH < 6,3 của CTS và điện tích âm tồn tại trên bề mặt vi khuẩn. Kết quả là dẫn đến sự thay đổi tính thấm của màng tế bào vi khuẩn, và ảnh hưởng đến sự nguyên vẹn của tế bào, phá hủy thành tế bào và làm rò rỉ các chất các chất điện giải trong tế bào như các ion kali, và các thành phần protein có trọng lượng phân tử thấp khác (như protein, axit nucleic, glucoza, và lactat dehydrogenaza), dẫn đến chết tế bào [18].

Bảng 3. Giá trị MIC, MBC của TD quả màng tang và CTS đối với vi khuẩn kiểm nghiệm

	<i>E. coli</i>			<i>S. typhimurium</i>			<i>S. aureus</i>			<i>B. cereus</i>		
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC
TD	5,53*	11,06	2,0	5,53	11,06	2,0	5,53	7,37	1,3	5,53	22,12	4,0
CTS	0,60*	0,80	1,1	0,70	0,80	1,1	0,80	1,00	1,3	0,80	1,00	1,3

Chú thích: * Nồng độ tinh dầu, chitosan mg/mL; MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu; MBC: Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu; TD: tinh dầu; CTS: chitosan

Bảng 4. Tương tác của TD quả màng tang và CTS đối với chủng vi khuẩn kiểm nghiệm

Chủng VSV kiểm định	Loại	MIC		FIC	ΣFIC	Tương tác
		Riêng phần	Kết hợp			
<i>E. coli</i>	TD <i>L. cubeba</i>	5,53*	0,69	0,12	0,62	Cộng hợp
	Chitosan	0,60*	0,30	0,5		
<i>S. aureus</i>	TD <i>L. cubeba</i>	5,53	0,69	0,12	0,62	Cộng hợp
	Chitosan	0,80	0,40	0,5		
<i>S. typhimurium</i>	TD <i>L. cubeba</i>	5,53	0,69	0,12	0,62	Cộng hợp
	Chitosan	0,70	0,35	0,5		
<i>B. cereus</i>	TD <i>L. cubeba</i>	5,53	0,92	0,17	0,67	Cộng hợp
	Chitosan	0,80	0,40	0,5		

Chú thích: * Nồng độ tinh dầu, chitosan: mg/mL; MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu; FIC: Nồng độ ức chế riêng phần; TD: tinh dầu

3.2. Tương tác kháng khuẩn giữa tinh dầu màng tang và chitosan

Để tăng cường khả năng kháng khuẩn, TD màng tang được sử dụng kết hợp với CTS, tác dụng tương tác được đánh giá thông qua giá trị *FIC*. Bảng 4 cho thấy, giá trị *FIC* dao động trong khoảng 0,62 - 0,67 khi kết hợp TD màng tang và CTS đối với vi khuẩn kiểm nghiệm, tương tác kháng khuẩn giữa TD màng tang và CTS khi thử nghiệm với 4 chủng vi khuẩn trên thực phẩm đều xảy ra tương tác cộng hợp ($0,5 < FIC < 1,0$). Khi sử dụng ở dạng phức hợp, nồng độ kháng khuẩn của TD màng tang giảm đi 6 - 8 lần và CTS giảm đi 2 lần so với khi sử dụng riêng lẻ đối với các chủng kiểm định. Nghiên cứu của Sharafati và cs. (2016) đã mô tả hiệu ứng khác nhau khi kết hợp giữa TD hạt thì là ở nồng độ 0,5%; 1%; 2%, TD khuynh diệp ở nồng độ 0,5%; 1%; 2% và chitosan cho việc bảo quản thịt gà. Hỗn hợp CTS và TD có khả năng kháng lại *Shigella dysenteriae*, *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *Streptococcus pyogenes* [7]. Sự giảm đáng kể giá trị *MIC* khi sử dụng hỗn hợp TD màng tang với CTS so với khi sử dụng riêng lẻ được giải thích bằng sự hiện diện của các thành phần kháng khuẩn khác nhau trong hỗn hợp. TD màng tang và CTS hỗ trợ lẫn nhau trong việc phá vỡ màng tế bào của vi khuẩn, từ đó làm thay đổi khả năng thâm thấu, gây rò rỉ chất nội bào dẫn đến sự chết tế bào.

4. Kết luận

Nghiên cứu cho thấy TD quả màng tang *L.cubeba*, CTS và phức hợp TD-CTS có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh thực phẩm thường gặp. Khi sử dụng ở dạng phức hợp, TD và CTS thể hiện tương tác cộng hợp với giá trị nồng độ kháng khuẩn giảm đi từ 2 - 8 lần so với khi sử dụng riêng lẻ. Việc giảm đáng kể nồng độ của TD cũng như CTS sẽ làm giảm các tác dụng phụ không mong muốn của các chất kháng khuẩn khi sử dụng trong thực phẩm. Các kết quả thu được chứng minh tiềm năng ứng dụng của TD, CTS và phức hợp TD-CTS trong bảo quản thực phẩm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội trong đề tài mã số T2018-PC-203.

Tài liệu tham khảo

- [1] P. T. Huyen, Medicinal plant resources in Vietnam, in EBSEA 2014, Exploring Biodiversity for Sustainable Development in South East Asia, 2014, Ha Noi, Vietnam.
- [2] Y. Chen, Y. Wang, X. Han, L. Si, Q. Wu, L. Lin, Biology and chemistry of *Litsea cubeba*, a promising industrial tree in China. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2) (2013) 103-111. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.751559>
- [3] H. Wang and Y. Liu, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different

parts of *Litsea cubeba*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(1) (2010) 229-235. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800349>

- [4] H. V. Nguyen, J. C. Meile, M. Lebrun, D. Caruso, S. Chu-Ky, S. Sarter, *Litsea cubeba* leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 66(3) (2018) 207-214. <https://doi.org/10.1111/lam.12837>
- [5] J. R. Calo, P. G. Crandall, C. A. O'Bryan, S. C. Ricke, Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54 (2015) 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- [6] P. Tongnuanchan and S. Benjakul, Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7) (2014) R1231-R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- [7] C. F. Sharafati, M. Taghizadeh, M. Rafieian-kopaei, C. R. Sharafati, Effect of chitosan incorporated with cumin and eucalyptus essential oils as antimicrobial agents on fresh chicken meat, *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(3) (2016) 396-404. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12616>
- [8] J. Bonilla, M. Vargas, L. Atarés, A. Chiralt, Effect of chitosan essential oil films on the storage-keeping quality of pork meat products. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8) (2014) 2443-2450. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1329-3>
- [9] H. Wang, and Y. Liu, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Litsea cubeba*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(1) (2010) 229-235. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800349>
- [10] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan and P. Bourke, Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiology*, 26(2) (2009) 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>
- [11] J. E. Patterson, Mc. E. Leticia, P. W. Nathan, In vitro activity of essential oils against gram-positive and gram-negative clinical isolates, including carbapenem-resistant enterobacteriaceae, *Open Forum Infectious Diseases*, 6(12) (2019) <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz502>
- [12] M. Islam, S. M. Masum, K. R. Mahbub, and M. Haque, Antibacterial activity of crab-chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Journal of Advanced Scientific Research*, 2(4) (2011) 63-66.
- [13] S. Zivanovic, S. Chi, A.F. Draughon, Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils, *Journal of Food Science*, 70(1) (2005) M45-M51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09045.x>
- [14] S. A. Hammid and F. Ahmad, Chemotype of *Litsea cubeba* essential oil and its bioactivity, *Natural Product Communications*, 10(7) (2015) <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000741>

- [15] S.O. Voundi, M. Nyegue, I. Lazar, D. Raducanu, F.F. Ndoye, M. Stamate, F.X. Etoa, Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria, *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6) (2015), 551-559.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1892>
- [16] Li, W. R., Shi, Q. S., Liang, Q., Xie, X. B., Huang, X. M., Chen, Y. B., Antibacterial activity and kinetics of *Litsea cubeba* oil on *Escherichia coli*, *PLoS One*, 9(11) (2014) e110983.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110983>
- [17] M. E. Badawy and E. I. Rabea, A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (2011) 1-29.
<https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- [18] E. Pereira dos Santos, P. H. M. Nicácio, F. Coêlho Barbosa, H. Nunes da Silva, A. L. S. Andrade, M. V. Lia Fook, I. Farias Leite, Chitosan/essential oils formulations for potential use as wound dressing: physical and antimicrobial properties, *Materials*, 12 (14) (2019) 2223.
<https://doi.org/10.3390/ma12142223>