

Nghiên cứu tổng hợp màng kháng khuẩn dựa trên chitosan và chiết xuất Trầu không ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm

Nguyễn Thị Thương*, Hoàng Ngọc Bích

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

*nthithuong@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu này cho thấy việc tổng hợp thành công bao bì hoạt tính có thể ăn được dựa trên sự kết hợp chitosan và chiết xuất lá Trầu không (BL). Màng composit chứa hàm lượng BL thấp (1-3%) được tổng hợp thông qua phương pháp phối trộn đơn giản. Kết quả phân tích SEM cho thấy có sự phân tán đồng nhất của BL vào trong mạch chitosan khi sử dụng hàm lượng BL thấp hơn 3%. Với hàm lượng chiết BL tăng từ 1-3%, độ truyền quang của màng composit giảm đáng kể trong khi độ mờ tăng. Ngoài ra, việc kết hợp BL đã cải thiện đáng kể hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh *samonella typhimurium* của màng chitosan. Màng chitosan-BL cho thấy ức chế hoàn toàn *samonella typhimurium* sau 6, 12 và 24 giờ nuôi cấy ở tất cả các nồng độ 1, 2 và 3% BL. Những kết quả đạt được cho thấy tiềm năng của màng chitosan kết hợp với chiết xuất Trầu không trong ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm.

Nhận 30.08.2018
Được duyệt 28.10.2018
Công bố 25.12.2018

Từ khóa
chitosan,
chiết xuất Trầu không,
màng kháng khuẩn,
samonella typhimurium.

© 2018 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. Như đã biết, chitosan, một sản phẩm được diacetyl hóa từ chitin có tính kháng khuẩn, có khả năng phân hủy sinh học và có tiềm năng quan trọng trong công nghiệp thực phẩm. Dựa vào những ưu điểm này, nó được ứng dụng để chế tạo những bao bì hoạt tính thay cho các loại vật liệu bao bì truyền thống như nhựa polypropylene, nhựa polyethylene,... và giảm thiểu sự ô nhiễm môi trường[1]. Tuy nhiên, việc cải thiện hoạt tính kháng khuẩn nhiều hơn nữa cho bao bì chitosan là cần thiết và trở thành mối quan tâm nhiều năm nay. Nhiều tác nhân kháng khuẩn tổng hợp như BHT và BHA được thêm vào cũng cho những tính chất rất tốt[2]. Bên cạnh đó, những chất độn vô cơ giống như Ag, CuO, TiO₂ cũng được kết hợp để cải thiện hoạt tính kháng khuẩn [3,4]. Tuy nhiên, việc sử dụng những phụ gia tổng hợp đem lại những nỗi lo là có khả năng ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường. Do đó, phụ gia hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên đã và đang là giải pháp

thay thế hiệu quả. Thực vậy, rất nhiều tinh dầu tự nhiên đã được kết hợp vào trong mạch chitosan cũng cho những tính chất kháng khuẩn tuyệt vời, nhưng việc xử dụng tinh dầu đang đối mặt với nhiều nhược điểm như nhạy với các tác nhân môi trường và khó kiểm soát được tốc độ di hành của nó vào thực phẩm[5,6]. Gần đây, việc kết hợp những chiết xuất tự nhiên giàu hợp chất phenolic vào màng chitosan để có được những hoạt tính kháng khuẩn mong muốn cũng đã được nghiên cứu. Đến nay, vẫn còn nhiều nỗ lực để tìm kiếm sự kết hợp tốt hơn của chitosan và phụ gia tự nhiên để giải quyết những thách thức còn tồn tại.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp màng composit có thể ăn được dựa trên sự kết hợp của chitosan và chiết xuất Trầu không (BL) có tiềm năng ứng dụng trong bao bì đóng gói thực phẩm. Trầu không thuộc loại cây gia vị có giá trị cao trong y sinh, phát triển ở nhiều vùng phía Nam của Việt Nam. Lá trầu là phần được sử dụng phổ biến nhất nhờ hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư và kháng oxi hóa [7-9]. Một số báo cáo đã được công bố cho thấy, lá trầu giàu thành phần polyphenolic bao gồm: hydroxyl chavicaol, 4-chromanol và eugenol, những thành phần có liên quan đến hoạt tính sinh học của lá trầu. Vì vậy, chiết xuất của lá trầu có khả năng chống lại các khuẩn gram dương (*staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermis*,

bacillus cereus, *bacillus subtilis*, *listeria monocytogenes*) và các khuẩn gram âm bacteria (*escherichia coli*, *salmonella typhimurium*, *salmonella enterididis*, *klebsiella pneumonia*, *pseudomonas aeruginosa*) [10]. Như vậy, việc kết hợp tinh dầu Tràu không 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 vào xu hướng phát triển của màng thực phẩm hoạt tính.

2 Thực nghiệm

2.1 Nguyên liệu

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. Tràu không sau khi thu mua được rửa sạch, cắt nhỏ và phơi khô. Sau khi phơi khô, lá tràu được nghiền mịn thành dạng bột. Bột được chiết ba lần bằng dung môi ethanol (99,9%) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết sau đó được lọc qua giấy lọc, cô cạn bằng máy cô quay chân không ở 35°C để tạo thành cao chiết tràu.

2.2 Chế tạo màng kháng khuẩn

Dung dịch chitosan (1%, w/v) được hòa tan vào trong dung dịch axit axetic (1%, v/v) dưới điều kiện khuấy từ ở tốc độ 800 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi chitosan được hòa tan hoàn toàn, chiết xuất Tràu không được thêm vào dung dịch polymer ở các nồng độ 1%, 2%, 3% (w/v) và được khuấy trong 1 giờ. Các dung dịch chứa polymer và chiết xuất sau khi đồng nhất được ly tâm trong 2 phút để loại bỏ cặn và bọt khí trước khi đổ màng. Màng sau khi được chế tạo bằng phương pháp casting trên đĩa petri có kích thước 12cm x 12cm, sấy khô ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ.

2.3 Xác định hoạt tính kháng khuẩn của màng composit

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.aeruginosa*, *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, 12 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:

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1 V f_1 + \dots + n_i V f_i}$$

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

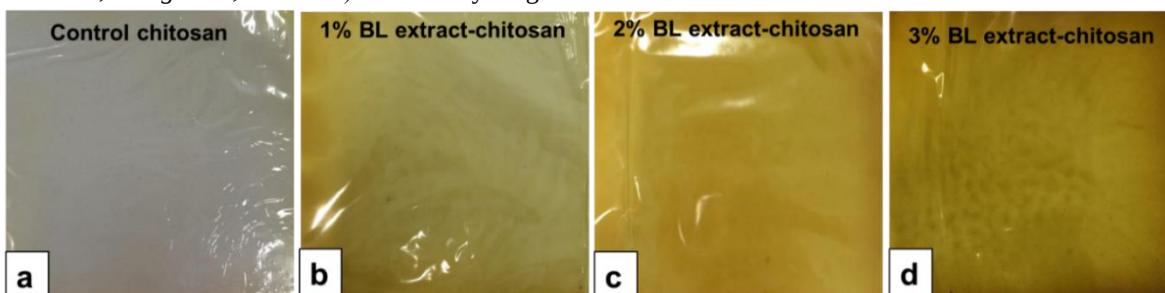
V : thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i : độ pha loãng tương ứng.

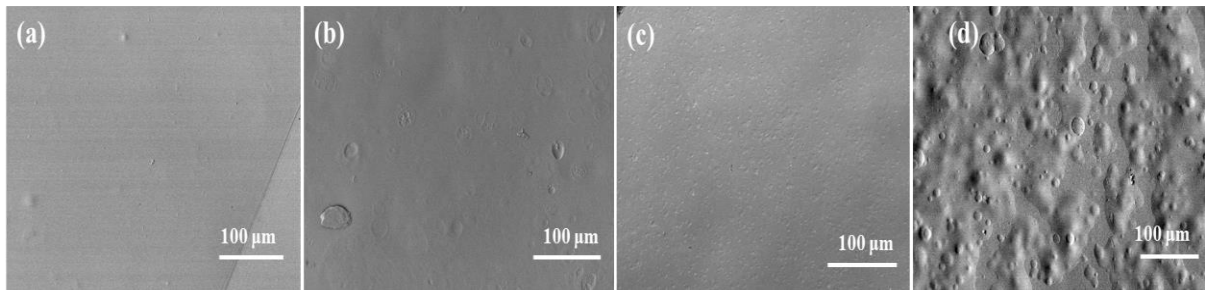
3 Kết quả và biện luận

3.1 Sự phân tán của chiết Tràu không trong màng composit

Màng chitosan và màng chitosan kết hợp với chiết xuất Tràu không (BL) với những hình ảnh được quan sát trong Hình 1. Ảnh thực của màng chitosan cho thấy màu trắng đục, sáng bóng và không có vết nứt trong khi màng chitosan kết hợp với chiết có màu nâu sáng. Về bề ngoài, màng composit ít sáng hơn khi tăng hàm lượng BL. Màng composit khi kết hợp với 1% và 2% BL xuất hiện khá đồng nhất và không có nếp nhăn trong khi màng với 3% BL quan sát thấy nhiều nếp nhăn và bọt khí. Theo kết quả phân tích SEM, bề mặt màng trở nên xù xì khi tăng hàm lượng BL từ 1% đến 3%. Tuy nhiên, bề mặt màng đồng nhất và không có khuyết tật lớn với nồng độ BL thấp hơn 3%. Điều này chứng tỏ có sự tương hợp tốt giữa mạch chitosan và BL ở hàm lượng BL thấp hơn 3%. Tuy nhiên, khi kết hợp với hàm lượng BL cao hơn 3%, sự hình thành nhiều lỗ hổng lớn có thể là do sự bay hơi của những hợp chất và các dung môi trong quá trình sấy khô với sự kết tụ các thành phần chiết[11].



Hình 1 Hình ảnh của màng chitosan (a), chitosan-BL-1% (b), chitosan-BL-2% (c), chitosan-BL-3% (d)



Hình 2 Ảnh SEM của màng chitosan (a), chitosan-BL-1% (b), chitosan-BL-2% (c), chitosan-BL-3% (d)

3.2 Tính chất quang của màng composit

Sự truyền ánh sáng qua màng là một trong những yếu tố gây ra quá trình oxy hóa, mất dinh dưỡng và mất màu của sản phẩm bên trong bao bì. Vì vậy, trong nghiên cứu này, hai thông số là độ truyền quang và độ mờ của màng cũng được xác định trong Bảng 1. Kết quả cho thấy, màng chitosan cho độ truyền quang cao hơn màng composit. Giá trị độ truyền quang của màng chitosan và màng chitosan kết hợp với 1, 2 và 3% BL tương ứng là 90,7%; 75,2%; 45,0% và 24,9%. Những kết quả đạt được cho thấy khả năng cản

sáng rất tốt của màng chitosan kết hợp với BL. Kết quả này có thể dựa vào sự tương tác của mạch chitosan với các thành phần phenolic của dịch chiết[12]. Những báo cáo của Kata và các đồng nghiệp cũng cho kết quả tương tự khi kết hợp chiết xuất bạc hà vào chitosan [13]. Tuy nhiên, độ mờ của màng chitosan khi kết hợp với BL tăng, có thể bị ảnh hưởng bởi sự sắp xếp lại cấu trúc polymer[14]. Điều này có thể chứng tỏ ảnh hưởng của quá trình khâu mạng hình thành từ liên kết hydrogen giữa các hợp chất phenolic[13].

Bảng 1 Thông số độ truyền quang và độ mờ của màng chitosan, chitosan-BL-1%, chitosan-BL-2%, chitosan-BL-3%

Tính chất	CH	CH-BL-1	CH-BL-2	CH-BL-3
Độ truyền quang (%)	90.7±1.03	75.2±0.92	45±1.12	24.9±3.86
Độ mờ (%)	24.4±1.13	45±0.96	79.6±2.33	94.1±3.11

3.3 Hoạt tính kháng khuẩn của màng composit

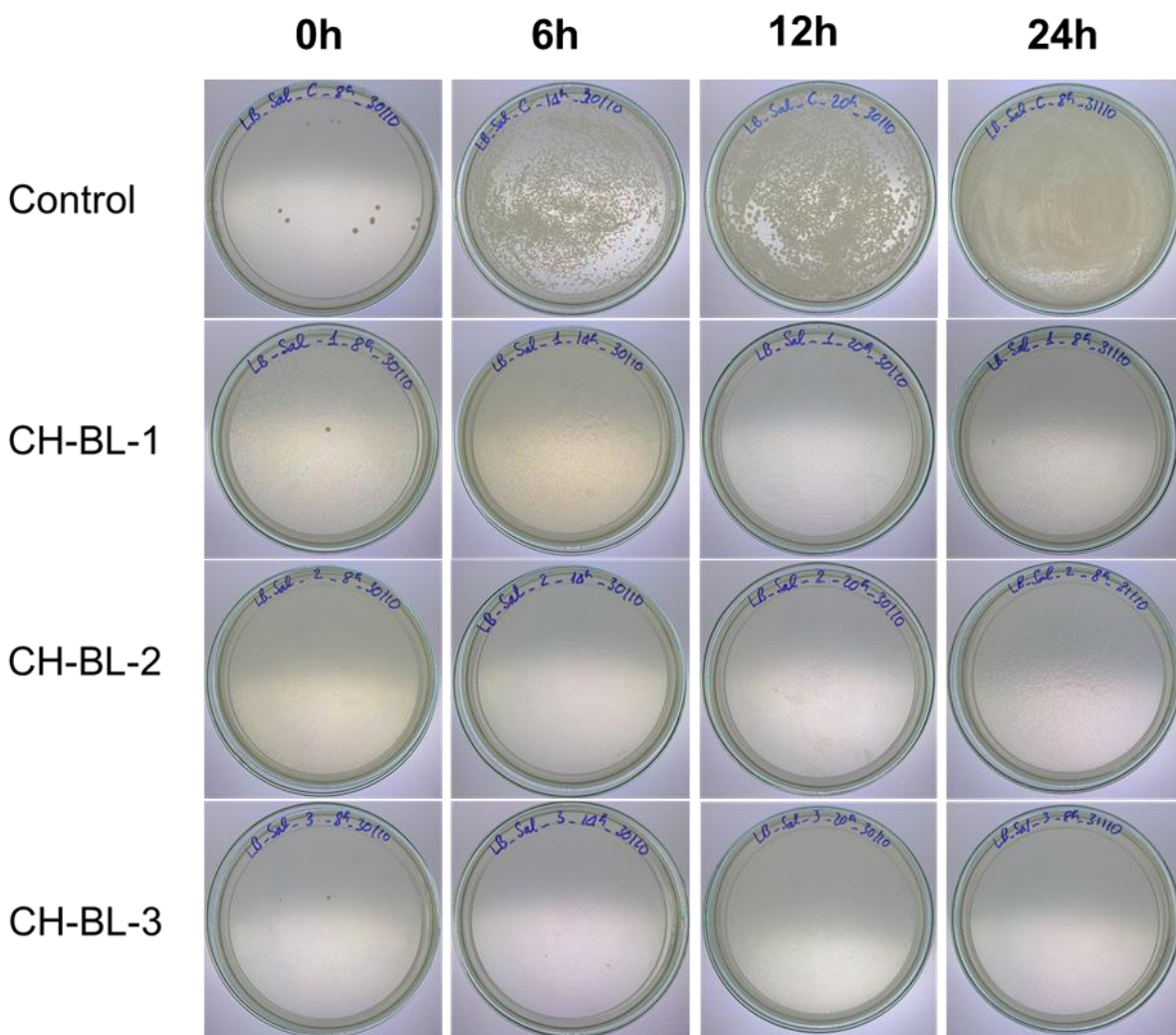
Hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan kết hợp với BL chống lại *salmonella typhimurium* được trình bày trong Hình 3. Số lượng colonies được ghi nhận sau 0, 6, 12 và 24 giờ tiếp xúc trong Bảng 2. Trong khi màng chitosan cho khả năng kháng khuẩn kém, sự phát triển của *salmonella typhimurium* bị ức chế mạnh khi BL được kết hợp vào trong màng chitosan sau 24 giờ tiếp xúc. Khả năng kháng

khẩn mạnh được tìm thấy sau 6 giờ tiếp xúc chỉ với hàm lượng BL ở 1%, dựa trên những hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất Trà không đã được báo cáo trong những nghiên cứu trước [9]. Những kết quả này cho thấy chiết xuất BL được kết hợp vào trong màng chitosan có thể trở thành vật liệu bao gói thực phẩm tuyệt vời cho việc chống lại những vi khuẩn gây bệnh.

Bảng 2 Bảng kết quả định lượng kháng khuẩn của màng chitosan, chitosan-BL-1%, chitosan-BL-2%, chitosan-BL-3%

Loại vi khuẩn	Cấu trúc màng	Số lượng colonies (CFU/ml)			
		0 h	6 h	12 h	24 h
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Mẫu đối chứng	1.1×10^6	+++++	+++++	+++++
	CH-BL-1%	1×10^5	-	-	-
	CH-BL-2%	5×10^4	-	-	-
	CH-BL-3%	1×10^5	-	-	-

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



Hình 3 Hoạt tính kháng khuẩn của màng màng chitosan, chitosan-BL-1%, chitosan-BL-2%, chitosan-BL-3%

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, màng kháng khuẩn dựa trên chitosan được tổng hợp thành công bằng việc kết hợp trực tiếp chiết xuất Trà không (BL), như một nguồn polyphenolic tự nhiên vào trong mạch chitosan. Ở nồng độ BL kết hợp thấp hơn 3% cho thấy sự phân tán đồng đều của dịch chiết trong màng composit. Khả năng kháng khuẩn mạnh chống lại *salmonella typhimurium* được tìm thấy trong màng chitosan

kết hợp với hàm lượng nhỏ chiết xuất Trà không. Những kết quả thu được cho thấy rằng, màng chitosan kết hợp với chiết xuất Trà không là vật liệu hứa hẹn với hoạt tính kháng khuẩn tuyệt vời cho ứng dụng bảo quản thực phẩm.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp trường ĐH Nguyễn Tất Thành, Mã số: 2018.01.10/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Aider, M., *Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review*. LWT - Food Science and Technology, 2010. 43(6): p. 837-842.
2. Quezada-Gallo, J.-A., *Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings*, in *Edible Films and Coatings for Food Applications*, K.C. Huber and M.E. Embuscado, Editors. 2009, Springer New York: New York, NY. p. 315-333.
3. Kaewklin, P., et al., *Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. 112: p. 523-529.
4. Nouri, A., et al., *Enhanced Antibacterial effect of chitosan film using Montmorillonite/CuO nanocomposite*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. 109: p. 1219-1231.
5. Mahdavi, V., S.E. Hosseini, and A. Sharifan, *Effect of edible chitosan film enriched with anise (Pimpinella anisum L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger*. Food Science & Nutrition, 2018. 6(2): p. 269-279.
6. Souza, V.G.L., et al., *Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants*. Industrial Crops and Products, 2017. 107: p. 565-572.
7. Dasgupta, N. and B. De, *Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro*. Food Chem, 2004. 88(2): p. 219-224.
8. Fazal, F., et al., *The phytochemistry, traditional uses and pharmacology of Piper Betel. linn (Betel Leaf): A pan-asiatic medicinal plant*. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2014.
9. Nouri, L., A. Mohammadi Nafchi, and A.A. Karim, *Phytochemical, antioxidant, antibacterial, and α -amylase inhibitory properties of different extracts from betel leaves*. Industrial Crops and Products, 2014. 62: p. 47-52.
10. Loganathan, M., et al., *Optimization studies on extraction of phytocomponents from betel leaves*. Resource-Efficient Technologies, 2017. 3(4): p. 385-393.
11. Rubilar, J.F., et al., *Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract*. Journal of Food Engineering, 2013. 115(4): p. 466-474.
12. Kaya, M., et al., *Production and characterization of chitosan based edible films from Berberis crataegina's fruit extract and seed oil*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018. 45: p. 287-297.
13. Talon, E., et al., *Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts*. Carbohydr Polym, 2017. 157: p. 1153-1161.
14. Dias, M.V., et al., *Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated alpha-tocopherol*. Food Chemistry, 2014. 165: p. 323-9.

Preparation of antimicrobial coatings based on the incorporation of chitosan and Piper betle Linn extract for application in food packaging

Nguyen Thi Thuong*, Hoang Thi Ngoc Bich

NTT Institute of Hi-Technology, Nguyen Tat Thanh University

*nthithuong@ntt.edu.vn

Abstract The current work aims to successfully fabricate edible active packaging based on the combination of chitosan and Piper betle Linn extract (BL). The blend films containing low BL content (1-3%) were prepared via a facile solvent casting technique. The SEM analyses showed the homogeneous dispersion of BL in chitosan matrix at BL concentration of below 3%. The light transmittance of composite films significantly decreased while haze percentage increased with increasing BL content from 1% to 3%. Furthermore, BL extract incorporated into chitosan film improved antimicrobial activities against *salmonella typhimurium*. It is found that chitosan-BL films exhibited strong inhibitory effects against *salmonella typhimurium* after 6, 12 and 24 hr exposed at 1-3% BL concentration. The results of this study nominate the as-prepared BL-incorporated chitosan as a very promising material for application in food package.

Key words antibacterial activity; chitosan; food packaging; Piper betel Linn, *salmonella typhimurium*.