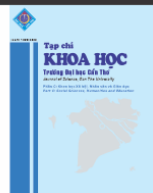




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ thực phẩm

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2021.022

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH CỦA TINH DẦU VỎ BƯỞI NĂM ROI (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)

Huỳnh Xuân Phong¹, Mai Kim Ngân¹, Trần Thị Thảo Nguyên¹, Lưu Minh Châu¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Bạch Long Giang², Mai Huỳnh Cang³, Nguyễn Tấn Dũng⁴ và Nguyễn Văn Ấy^{5*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³Bộ môn Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM

⁴Khoa Công nghệ hóa học và Thực phẩm, Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật TP. HCM

⁵Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Ấy (email: nvay@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The aims of this study were to analyze the chemical composition and to investigate the antimicrobial activity of pomelo peel oil (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) extracted by steam distillation method. The antibacterial ability of essential oils was evaluated at different concentrations (50%, 25%, 10% and 5%) by agar well diffusion method with *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli*. The anti-mould activity of essential oils was also tested with *Aspergillus flavus* by agar well diffusion method. An average yield of 1.78% essential oil was achieved from pomelo peel and 25 main components in essential oil were analyzed, including terpenes, alcohols, aldehydes. The ability to inhibit 3 strains *S. aureus*, *B. cereus* and *E. coli* at the essential oil concentrations of 50% of the antibacterial diameter were 15.67 ± 0.76 mm, 14.0 ± 0.92 mm and 12.33 ± 0.57 mm, respectively; at 25% concentrations were 13.33 ± 0.58 mm, 11.0 ± 0.87 mm and 9.33 ± 0.58 mm. Results of resistance to *A. flavus* fungus by agar well diffusion method with antifungal performance at essential oil concentrations (50%, 25%, 10% and 5%) were 81.24 ± 2.25%, 62.58 ± 2.04%, 26.19 ± 2.02%, and 8.35 ± 2.24%, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này thực hiện nhằm xác định thành phần hóa học và khảo sát được các hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của tinh dầu với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* và *Escherichia coli* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch với nồng độ tinh dầu (50%, 25%, 10% và 5%). Đánh giá khả năng kháng nấm mốc được thực hiện với *Aspergillus flavus* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Kết quả cho thấy hiệu suất tinh dầu thu được 1,78%, xác định được 25 thành phần chính trong tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi như các hợp chất terpen, rượu và aldehyde. Khả năng kháng 3 chủng vi khuẩn *S. aureus*, *B. cereus* và *E. coli* ở nồng độ tinh dầu 50% đường kính vòng kháng vi khuẩn lần lượt là 15,67 ± 0,76 mm, 14,00 ± 0,92 mm và 12,33 ± 0,57 mm; ở nồng độ 25% là 13,33 ± 0,58 mm, 11,00 ± 0,87 mm và 9,33 ± 0,58 mm. Kết quả kháng nấm mốc *A. flavus* với hiệu suất kháng nấm ở nồng độ tinh dầu 50%, 25%, 10% và 5% lần lượt là 81,24 ± 2,25%, 62,58 ± 2,04%, 26,19 ± 2,02% và 8,35 ± 2,24%.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 13/03/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

Title:

Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil extracted from pomelo peel (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)

Từ khóa:

Citrus grandis, kháng khuẩn, kháng nấm, tinh dầu, vỏ bưởi

Keywords:

Antibacterial, antifungal, *Citrus grandis*, essential oil, pomelo peels

1. GIỚI THIỆU

Ngày nay, xã hội không ngừng phát triển, vấn đề an toàn thực phẩm và sự độc hại của các loại hóa chất tổng hợp làm cho nhu cầu nghiên cứu và tách chiết các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên để ứng dụng ngày càng tăng. Từ xa xưa, các chất chiết xuất từ thực vật đã được sử dụng và cho đến nay tinh dầu thực vật đã thu hút được nhiều sự quan tâm do tính an toàn và dược lý của nó (Burt et al., 2004; Shaaban et al., 2012). Trái cây có múi nói chung, hay bưởi nói riêng đều rất giàu khoáng chất, vitamin C và các hợp chất polyphenolic, góp phần vào hoạt động chống oxy hóa (Tripoli et al., 2007) và tăng cường chức năng gan thông qua việc giảm tích tụ chất béo (Gliozzi et al., 2014). Ở nước ta, bưởi có giá trị kinh tế cao, sức sống mạnh, khả năng thích nghi cao với điều kiện và thổ nhưỡng của vùng nhiệt đới ẩm.

Việt Nam là nước có tiềm lực lớn về loại cây này, phục vụ nhu cầu trong và ngoài nước, do đó mà ngành công nghiệp chế biến thực phẩm và nông sản này tạo ra một lượng phụ phẩm đáng kể. Các sản phẩm phụ này được coi là nguồn cung cấp các thành phần chức năng có giá trị, chẳng hạn như flavonoid, chất xơ và tinh dầu (Senevirathne et al., 2009). Trong đó, tinh dầu nằm trong các tuyến ở lớp ngoài của vỏ trái cây và là sản phẩm phụ quan trọng nhất thu được từ vỏ. Các nghiên cứu đã cho thấy tinh dầu bưởi có nhiều hoạt tính sinh học. Nó được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn làm hỏng thực phẩm và các chủng gây bệnh (Viuda-Martos et al., 2008). Tinh dầu thu được từ vỏ bưởi bằng cách phương pháp chưng cất có tác dụng ức chế vi khuẩn và nấm đồng thời có thể được phát triển thêm để điều trị một số bệnh (Okunowo et al., 2013). Tinh dầu của bưởi cũng đã cho thấy hoạt động chống oxy hóa rất quan trọng trong việc bảo quản thực phẩm và ngăn ngừa bệnh tật (Teixeira et al., 2013). Do có nguồn gốc tự nhiên và an toàn nên chúng được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm (đồ uống, kem, bánh ngọt), mỹ phẩm và công nghiệp dược phẩm (Hardin et al., 2010; Ragusa, 2015; Tadtong et al., 2015).

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định thành phần hóa học của tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh của tinh dầu từ vỏ bưởi ở các nồng độ khác nhau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Nguyên liệu sử dụng để trích ly là vỏ bưởi Năm Roi được thu mua trên địa bàn thành phố Cần Thơ.

Các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235, *Escherichia coli* ATCC 25922 và nấm *Aspergillus flavus* ATCC 9643 từ Viện Lưu trữ giống Hoa Kỳ được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Các hóa chất chính được sử dụng bao gồm NaCl, Na₂SO₄ (Xilong, Trung Quốc), agar (Việt Nam), dimethyl sulfoxide (Merck, Đức), môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) và Nutrient broth (NB) (HiMedia Laboratories, Ấn Độ).

2.2. Ly trích tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Mục đích nhằm thu hồi tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và đánh giá hiệu suất tinh dầu được thu hồi. Phương pháp thực hiện dựa trên nghiên cứu của Nguyễn Đắc Phát (2011) được mô tả tóm tắt như sau: lấy 400 g nguyên liệu vỏ bưởi đã được sơ chế vào máy xay với 1088 mL nước cất và 12,2% NaCl (tương đương với 132,736 g), xay nhuyễn hỗn hợp trong 2 phút. Chuyển hoàn toàn hỗn hợp nguyên liệu vào bình cầu của hệ thống chưng cất và ngâm trong 2 giờ 20 phút. Tiến hành ly trích bằng hệ thống chưng cất hơi nước trong 1 giờ 45 phút, tinh từ khi giọt tinh dầu đầu tiên thu được. Thử nghiệm chưng cất được thực hiện 3 lần lặp lại.

2.3. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi

Mẫu tinh dầu sau khi được ly trích và xử lý với Na₂SO₄ được xác định thành phần hóa học ở Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng Cần Thơ (CATECH) bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC/MS) (Adams, 1995).

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh của tinh dầu từ bưởi

Mục đích nhằm khảo sát khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi. Các bước thực hiện được tiến hành theo phương pháp của Reeves (1989) có chỉnh sửa: hút 50 µL dịch tăng sinh của các chủng vi khuẩn chỉ thị (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*) ở mật số 10⁸ tế bào/mL, bơm vào đĩa thạch. Dùng tăm bông vô trùng rìa đều dịch vi khuẩn trên toàn bộ mặt đĩa thạch NA. Đóng nắp và để đĩa thạch ở nhiệt độ phòng cho đến khi thấy bề mặt môi trường đã khô. Sau khi môi trường đã khô, tiến hành tạo giếng với đường kính 6 mm. Pha loãng tinh dầu với DMSO 100% (v/v) để tạo thành dãy 4 nồng độ 50%, 25%, 10% và 5% v/v. Hút 100 µL tinh dầu,

DMSO 100% và ciprofloxacin 5 mg/mL vào trong mỗi giếng, để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng và sau đó đem ủ ở 37°C trong 24 giờ. Trong đó, ciprofloxacin 5 mg/mL và DMSO 100% v/v lần lượt là các đối chứng dương và đối chứng âm.

2.5. Khảo sát hoạt tính kháng nấm mốc *A. flavus* của tinh dầu vỏ bưởi

Mục đích của thử nghiệm nhằm khảo sát khả năng ức chế nấm mốc *A. flavus* của tinh dầu vỏ bưởi. Các bước thực hiện được tiến hành theo phương pháp của Mekonnen et al. (2016) có chỉnh sửa: chủng nấm mốc *A. flavus* đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 3-5 ngày). Tiến hành tạo khoanh khuẩn ty và đặt vào tâm đĩa môi trường PDA. Dùng ống hút vô trùng tạo giếng với đường kính 6 mm trên đĩa thạch PDA. Pha loãng tinh dầu với DMSO 100% (v/v) để tạo thành dãy 4 nồng độ 50%, 25%, 10% và 5% v/v. Hút 100 µL tinh dầu đã pha loãng với cùng một nồng độ vào trong 1 đĩa, để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng và sau đó đem ủ ở 30°C trong 72 giờ. Làm từng đĩa riêng với nystatin 0,5 mg/mL và DMSO 100% v/v để làm các đĩa đối chứng dương và đối chứng âm. Khả năng ức chế được đánh giá bằng cách đo đường kính khuẩn ty phát triển trong vòng 5 ngày so với đối chứng.

Chi tiêu theo dõi: đo đường kính khuẩn ty của nấm mốc sau 72 giờ và xác định tỷ lệ ức chế (%) bằng công thức: Khả năng ức chế (%) = [(DC - D)*100]/DC. Trong đó, DC là đường kính phát triển khuẩn ty trong đĩa đối chứng và D là đường kính phát triển khuẩn ty của từng nồng độ tinh dầu.

2.6. Phân tích và xử lý kết quả

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ly trích tinh dầu bưởi Năm Roi bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Kết quả lượng tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi thu hồi được sau khi chưng cất bằng phương pháp chưng cất hơi nước được (Bảng 1). Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi tinh dầu khoảng 1,73-1,85% theo trọng lượng tươi. Như vậy, có thể thấy khi ly trích 100 g mẫu, lượng tinh dầu thu hồi được là 1,78 mL. Kết quả này cao hơn so với hiệu suất tinh dầu thu hồi được theo nghiên cứu của Nguyễn Đắc Phát (2011) với hiệu suất đạt được là 1,49%. Nguyên nhân của sự sai khác về hiệu suất của các loại tinh dầu xuất

phát từ sự khác biệt sinh học của nguyên liệu thực vật, các phương pháp, các thông số ly trích cũng như điều kiện sinh sống của các loài thực vật (Gamarra et al., 2006). Ngoài ra, khi thu hoạch bưởi ở những giai đoạn tăng trưởng khác nhau hay thu hoạch vào các buổi khác nhau trong ngày cũng sẽ dẫn đến sự khác biệt hàm lượng tinh dầu, cụ thể là sẽ giảm dần từ buổi sáng đến trưa chiều (Bourgou et al., 2012).

Bảng 1. Thể tích (mL) và hiệu suất (%) tinh dầu trung bình thu hồi được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

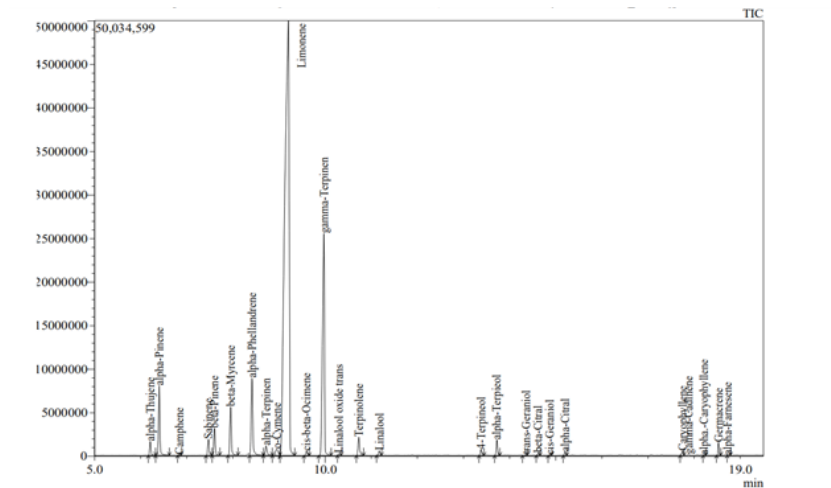
Thí nghiệm	Thể tích tinh dầu (mL)	Hiệu suất tinh dầu (%)
1	7,4	1,85
2	6,9	1,73
3	7,0	1,75
Trung bình	7,1	1,78

3.2. Thành phần hóa học của tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi

Thành phần hóa học của tinh dầu được trình bày chi tiết ở Bảng 2 và sắc ký đồ GC của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi được trình bày ở Hình 1.

Bảng 2. Thành phần hóa học của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi

Số thứ tự	Tên thành phần	Công thức phân tử	%
1	α-Thujene	C ₁₀ H ₁₆	0,64
2	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	3,34
3	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	0,03
4	Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	0,81
5	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	1,37
6	β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	2,58
7	α-Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	4,46
8	α-Terpiene	C ₁₀ H ₁₆	0,63
9	θ-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	0,62
10	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	66,79
11	Cis-β-Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0,22
12	γ-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	15,07
13	Linalool oxide trans	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,09
14	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	1,03
15	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0,24
16	4-Terpinenol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,29
17	α-Terpieol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,72
18	trans-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,04
19	β-Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,11
20	cis-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,03
21	α-Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,16
22	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0,22
23	α-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0,02
24	Germacrene	C ₁₅ H ₂₄	0,46
25	α-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0,03



Hình 1. Sắc ký đồ GC/MS của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi (0-19 min)

Kết quả phân tích cho thấy các thành phần trong tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi chủ yếu bao gồm các hợp chất terpen, rượu, aldehyde và được chia thành các nhóm như sau: nhóm monoterpen (alpha-pinene, beta-pinene, limonen, alpha-thujene, camphene, sabinene, beta-myrcene, alpha-terpinen, o-cymene, cis-beta-ocimene, gamma-terpinen, alpha-phellandrene); nhóm sesquiterpen (caryophyllene, alpha-caryophyllene, terpinolene, alpha-farnesene, germacrene); nhóm alcohol (linalool, linalool oxide trans, 4-terpineol, alpha-terpineol trans-geraniol, cis-geraniol) và nhóm aldehyde (alpha-citral, beta-citral). Phân tích theo phương pháp sắc ký khí GC/MS đã xác định được 25 hợp chất trong tinh dầu bưởi Năm Roi. Kết quả này cao hơn khi phân tích thành phần của dầu Oregano với 21 hợp chất và thấp hơn kết quả khi phân tích tinh dầu gừng (36 hợp chất) và tinh dầu hạt thìa là đen (29 thành phần) (Ashraf et al., 2017). Nhìn chung, các loại tinh dầu chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học dồi dào nên có thể được sử dụng trong các nghiên cứu sâu hơn để ức chế vi khuẩn gây bệnh.

Kết quả sắc ký đồ ở Hình 1 cho thấy hai hợp chất có diện tích peak lớn nhất theo thứ tự là limonene (66,79%) và γ -terpinen (15,07%). Điều này có nghĩa là trong tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi thì hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất là limonene và γ -terpinen. Đây là những cấu phần đặc trưng của hầu hết tinh dầu của vỏ quả họ *Citrus*. Ngoài ra, pinene cũng chiếm khoảng 4,71%, trong đó α -pinene (3,34%) và β -pinene (1,37%) với hàm lượng tương đối lớn trong sản phẩm tinh dầu thu được. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi của Nguyễn Đắc Phát (2011) và tương đồng với kết quả phân tích tinh dầu vỏ bưởi của Thavanapong (2006). Các thành phần còn lại là α -

phellandrene (4,46%), β -myrcene (2,58%) và terpinolene (1,03%). Tóm lại, nhóm terpen chiếm khoảng 98,32% tổng số hợp chất trong tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi và số lượng các hợp chất không xác định khác có trong tinh dầu là không đáng kể.

3.3. Hoạt tính kháng vi khuẩn của tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi

Kết quả được trình bày ở Bảng 3 cho thấy tinh dầu được ly trích từ vỏ bưởi Năm Roi đều có khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus*, *B. cereus* và *E. coli* ở các nồng độ tinh dầu 50, 25, 10 và 5%. Trong đó, sự ức chế sinh trưởng đối với 3 chủng vi khuẩn dưới tác động của kháng sinh ciprofloxacin 0,5 mg/mL là cao nhất với trung bình đường kính vòng vô khuẩn là $48,33 \pm 1,52$ mm ở *S. aureus*, *B. cereus* là $44,69 \pm 2,08$ mm và $42,67 \pm 1,43$ mm ở *E. coli*.

Cả 3 chủng vi khuẩn vẫn phát triển và không tạo đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVVK) với giếng chứa đối chứng âm DMSO 100%. Có thể thấy sự ức chế sinh trưởng tỷ lệ thuận với nồng độ tinh dầu, điều này có nghĩa là ĐKVVK giảm dần theo sự giảm của nồng độ tinh dầu. Sự ức chế vi khuẩn *E. coli* ở nồng độ 50% có ĐKVVK là $12,33 \pm 0,57$ mm, đây là giá trị lớn nhất, kế tiếp lần lượt là nồng độ 25% với ĐKVVK là $9,33 \pm 0,58$ mm, ở 10% thì ĐKVVK là $8,17 \pm 0,28$ mm và cuối cùng ĐKVVK chỉ bằng $7,17 \pm 0,29$ mm khi nồng độ tinh dầu là 5%. Đối với vi khuẩn *S. aureus* ở nồng độ 50% có ĐKVVK là $15,67 \pm 0,76$ mm, kế tiếp lần lượt là nồng độ 25%, 10% và 5% với ĐKVVK lần lượt là $13,33 \pm 0,58$ mm, $11,00 \pm 0,97$ mm và $9,67 \pm 0,57$ mm và cuối cùng sự kháng khuẩn của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi với vi khuẩn *B. cereus* có đường kính vô vòng vô khuẩn ở các nồng độ 50%, 25%, 10%, 5% lần lượt là $14,00 \pm 0,92$ mm, $11,0 \pm 0,87$ mm, $9,5 \pm 0,52$ mm

và $9,0 \pm 0,11$ mm. Có thể giải thích rằng hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu là do sự tác động lên cấu trúc và chức năng của tế bào. Tính kỵ nước đặt trung của tinh dầu là nguyên nhân gây ra sự phá vỡ cấu trúc tế của vi khuẩn màng thẩm chọn lọc của tế bào là không thể thiếu đối với nhiều chức năng của tế bào như các quá trình vận chuyển các chất qua màng và điều hòa trao đổi chất, và duy trì áp suất thẩm thấu. Trên thực tế cơ chế về hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu bao gồm làm suy thoái thành tế bào như làm mất sự ổn định của lớp phospholipid (Gill & Holley, 2006), tăng tính thẩm làm phá hủy chức năng và thành phần màng sinh chất làm mất các thành phần quan trọng trong tế bào (Juven et al.,

1994). Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu của chi *Citrus* được cho là do thành phần limonene (chiếm tỷ lệ cao nhất) và điều này phù hợp với hầu hết các loại cây có mùi. Limonene là hợp chất dễ bay hơi với hoạt tính kháng khuẩn cao, chất oxy hóa mạnh và khả năng hòa tan thấp trong nước (Inouye et al., 2001). Bên cạnh đó, linalool, citral, α -phellandrene và β -myrcene cũng được biết đến là nguyên nhân chính cho khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây có mùi. Tuy nhiên, các nghiên cứu khác chỉ ra rằng hoạt động kháng khuẩn không chỉ được tạo ra bởi một thành phần chính cụ thể mà còn do tác dụng đối kháng và tương tác của nhiều loại hợp chất với nhau (Deba et al., 2007).

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của các chủng vi khuẩn sau 24 giờ

Vi khuẩn chỉ thị	Ciprofloxacin (0,5 mg/mL)	DMSO (100%)	Nồng độ của tinh dầu (%)			
			50	25	10	5
<i>S. aureus</i>	48,33 \pm 1,52	6,0 \pm 0,03	15,67 \pm 0,76 ^a	13,33 \pm 0,58 ^b	11,00 \pm 0,97 ^c	9,67 \pm 0,57 ^c
<i>B. cereus</i>	44,69 \pm 2,08	6,0 \pm 0,02	14,00 \pm 0,92 ^a	11,00 \pm 0,87 ^b	9,50 \pm 0,52 ^c	9,00 \pm 0,11 ^c
<i>E. coli</i>	42,67 \pm 1,43	6,0 \pm 0,02	12,33 \pm 0,57 ^a	9,33 \pm 0,58 ^b	8,17 \pm 0,28 ^c	7,17 \pm 0,29 ^d

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo kiểm định LSD. Đối chứng dương là ciprofloxacin và DMSO là đối chứng âm.

Kết quả này phù hợp với nhận định của Viuda-Martos et al. (2008) về ảnh hưởng của nồng độ tinh dầu với sự ức chế vi khuẩn *E. coli*. Cũng theo nghiên cứu của Aburowais et al. (2017), khi xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu thương mại *Citrus sinensis* và *Citrus limon* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch với mật số tế bào vi khuẩn đạt 0,5 McFarland. Kết quả cho thấy tinh dầu *Citrus sinensis* ức chế *S. aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 12 mm và không thể hiện hoạt tính ức chế đối với *E. coli*, tương tự đối với tinh dầu *Citrus limon*, cũng không xuất hiện vùng ức chế chống lại cả hai chủng vi khuẩn này (Aburowais et al., 2017). Năm 2019, Edogbanya et al. (2019) đã ly trích tinh dầu vỏ cam thông qua phương pháp ép lạnh và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn với khả năng kháng *S. aureus* ở nồng độ 30% với đường kính vòng kháng khuẩn là 13,75 mm và ở nồng độ 60% là 22,25 mm, tương tự đối với kháng *E. coli* ở nồng độ 30% là 6,0 mm và 60% là 13,25 mm. Tuy nhiên, tinh dầu chanh ở nồng độ 30% và 60% gần như không thể hiện hoạt tính kháng với *E. coli* và *S. aureus* (Edogbanya et al., 2019).

Nhìn chung, trong 3 chủng vi khuẩn chỉ thị, tinh dầu bưởi Năm roi có khả năng kháng *S. aureus* cao nhất, kế đến là *B. cereus* và cuối cùng là *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 15,67 \pm 0,76 mm, 14,00 \pm 0,92 mm và 12,33 \pm 0,57 mm ở nồng độ pha loãng 50%. Kết quả bước đầu cho thấy

tác động của tinh dầu lên vi khuẩn Gram dương mạnh hơn lên vi khuẩn Gram âm với ĐKVVK lớn hơn. Điều này có thể được giải thích bởi sự khác nhau của thành tế bào của hai loại vi khuẩn Gram âm và vi khuẩn Gram dương. Thành tế bào Gram dương gồm một lớp peptidoglycan dày bao bên ngoài màng sinh chất còn thành tế bào Gram âm với lớp peptidoglycan mỏng, cách một lớp không gian chu chất và tới lớp màng ngoài là phức hợp lipoprotein và lipopolysaccharide. Chính cấu trúc nhiều lớp này đã bảo vệ tế bào vi khuẩn Gram âm trước tác động của tinh dầu và khoảng không gian chu chất chứa độc tố và enzyme có thể làm mất tác dụng của tinh dầu trước khi tác dụng lên màng sinh chất (Wang et al., 2019). Khả năng kháng khuẩn được ghi nhận chủ yếu do trong thành phần của tinh dầu vỏ bưởi chứa các chất terpen (>98,0%), sự kháng khuẩn của α -pinene và β -pinene đã được chứng minh bởi Salehi et al. (2019).

3.4. Hoạt tính kháng nấm mốc *A. flavus* của tinh dầu bưởi Năm Roi

Bảng 4 cho thấy khả năng ức chế của tinh dầu vỏ bưởi năm roi từ 8,35 \pm 2,24% đến 81,24 \pm 2,25% tương ứng với nồng độ tinh dầu từ 5% đến 50%. Một nghiên cứu của Velázquez-Nuñez et al. (2013) về khả năng kháng nấm của vỏ quả cam (*Citrus sinensis* var. *valencia*) cho kết quả khả năng ức chế tối thiểu (MIC) đối với *A. flavus* là 16 g/L đối với

phương pháp pha loãng trong agar và 8 g/L đối với phương pháp tiếp xúc hơi. Kết quả nghiên cứu cho rằng hoạt tính kháng nấm do các thành phần chính trong tinh dầu vỏ cam, đó là các monoterpren bao

gồm limonene, β -byrcene, β -pinene, α -pinene và citral, trong đó limonene chiếm 66,79%. Từ đó cho thấy hiệu quả kháng *A. flavus* của tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi là phù hợp với nghiên cứu trên.

Bảng 6. Đường kính vòng kháng (mm) chủng nấm mốc *A. flavus* sau 72 giờ

Nấm mốc <i>A. flavus</i>	Đối chứng	Nồng độ tinh dầu pha loãng (%)			
		50	25	10	5
Đường kính khuẩn ty (%) ức chế	48,50 ± 1,73 ^e	9,10 ± 0,89 ^a	18,15 ± 0,79 ^b	35,80 ± 0,98 ^c	44,45 ± 0,88 ^d
	-	81,24 ± 2,25	62,58 ± 2,04	26,19 ± 2,02	8,35 ± 2,24

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo kiểm định LSD. Đối chứng dương là nystatin và DMSO là đối chứng âm

Tinh dầu cây có mùi là một hỗn hợp phức tạp của các hợp chất dễ bay hơi, trong số các đặc tính khác, hoạt tính chống nấm bằng cách giảm hoặc ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm theo cách phản ứng với liều lượng (Sharma & Tripathi, 2008). Theo nghiên cứu của Singh et al. (2010), tinh dầu của *C. maxima*, *C. sinensis* và hỗn hợp 2 loại tinh dầu này ở nồng độ 750 ppm đã ức chế hoàn toàn *A. flavus*. Ở 500 ppm, phần trăm bị ức chế của *A. flavus* là 48,1%, 46,2% và 44,0% tương ứng với tinh dầu của *C. maxima*, *C. sinensis* và hỗn hợp. Hoạt tính kháng nấm có thể được tạo ra bởi một hợp chất chính duy nhất hoặc do tác dụng đồng thời hoặc đối kháng của các hợp chất khác nhau (Fukuta et al., 2007).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy tinh dầu vỏ bưởi Năm Roi được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đạt hiệu suất 1,78% (v/w) với thành phần chính của tinh dầu là limonene (66,79%), γ -terpinen (15,07%), α -pinene (3,34%) và β -pinene (1,37%). Qua kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn và kháng mốc của tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi cho thấy khả năng và triển vọng ứng dụng của tinh dầu này trong ức chế các loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *S. aureus*, *B. cereus* và *E. coli* cũng như nấm mốc thường tạo độc tố trong thực phẩm là *A. flavus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua sự tài trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ “Nghiên cứu công nghệ sản xuất naringin và tinh dầu từ vỏ quả bưởi và xây dựng mô hình sản xuất thực nghiệm” (mã số: CT2020.01.TCT.07) thuộc Chương trình khoa học và công nghệ Bộ Giáo dục và Đào tạo “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến trong bảo quản, chế biến nông thủy sản vùng Đồng bằng Sông Cửu Long”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aburowais, A., Afreen, B., & Mehru, N. (2017). Activity of orange (*Citrus sinensis*) and lemon (*Citrus limon*) juice and oil on different bacteria that cause wound infection. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(1), 26-31.

Adams, R. P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.

Ashraf, S. A., Al-Shammari, E., Hussain, T., Tajuddin, S., & Panda, B. P., 2017. *In vitro* antimicrobial activity and identification of bioactive components using GC-MS of commercially available essential oils in Saudi Arabia. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 3948-3958.

Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, 2012, 528593.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

Deba F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. (2007). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19(4), 346-352.

Edogbanya, S., Olorunmola, J. B., & Oijagbe, I. J. (2019). Comparative study on the antimicrobial effects of essential oils from peels of three citrus fruits. *MOJ Biology and Medicine*, 4(2), 49-54.

Fukuta, M., Xuan, D. T., Deba, F., Tawata, S., Khanh, D. T., & Chung, M. I. (2007). Comparative efficacies *in vitro* of antibacterial, fungicidal, antioxidant, and herbicidal activities of momilatones A and B. *Journal of Plant Interactions*, 2(4): 245-251.

Gamarra, F. M. C., Sakanaka L. S., Tambourgi, E. B., & Cabral, F. A. 2006. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*)

- oil by distillation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1):147-151.
- Gill, A. O. & Holley, A. R. (2006). Disruption of *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Journal of Food Microbiology*, 108(1), 1-9.
- Gliozzi, M., Carresi, C., Musolino, V., Palma, E., Muscoli, C., Vitale, C., Gratteri, S., Muscianisi, G., Janda, E., & Muscoli, S. (2014). The effect of bergamot-derived polyphenolic fraction on LDL small dense particles and nonalcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome. *Advances in Biological Chemistry*, 4(2), 129-137.
- Hardin, A., Crandall, P. G., & Stankus, T. (2010). Essential oils and antioxidants derived from citrus by-products in food protection and medicine: An introduction and review of recent literature. *Journal of Agricultural and Food Information*, 11(2), 99-122.
- Inoue S., Takizawa T., & Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal Application of Bacteriology*, 76(6), 626-631.
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., & Taddese, S. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*, 2016, 9545693.
- Nguyễn Đắc Phát. 2011. Nghiên cứu chiết xuất tinh dầu từ vỏ bưởi Năm Roi (*Citrus grandis* (L.) Osbeck var. *grandis*) bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Nha Trang.
- Okunowo, W. O., Oyediji, O., Afolabi, L. O., & Matanmi, E. (2013). Essential oil of grapefruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences*, 4(4), 1-9.
- Ragusa, S. (2015). Physiology, taxonomy, and morphology of aromatic plants: A botanical perspective. In: Bagetta G, Cosentino M, Sakurada T, editors. *Aromatherapy: Basic Mechanisms and Evidence Based Clinical Use*. Hoepli. CRC Press.
- Reeves, D. S. (1989). Antibiotic assays. In: Hawkey PM, Lewis DA, editors. *Medical Bacteriology, a Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- Salehi S. U., Ilkay, E. O., Arun, K. J., Sumali, L. D., Jayaweera, Daniel, A. D., Farukh, S., Yasaman, T., Natalia, M., Navid, B., & William, C.C. (2019). Therapeutic potential of α - and β -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules*, 9(11), 738.
- Senevirathne, M., Jeon, Y. J., Ha, J., & Kim, S. H. (2009). Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity. *Journal of Food Engineering*, 92(2), 157-163.
- Shaaban, H. A. H., El-Ghorab, A. H., & Takayuki, S. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 203-212.
- Sharma, N. & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, anti-aflatoxinigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734-1740.
- Tadtong S., Kamkaen, N., Watthanachaiyingcharoen, R., & Ruangrunsi, N. (2015). Chemical components of four essential oils in aromatherapy recipe. *Natural Product Communications*, 10(6), 1091-1092.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunesa, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 587-595.
- Thavanapong, N. (2006). The Essential oil from peel and flower of *Citrus maxima*. M.Sc. thesis. Pharmacy of Silpakorn University, Thailand.
- Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Perez-Álvarez, J. (2008). Antibacterial activity of lemon (*Citrus limon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28(4), 567-576.
- Wang, L., Hu, W., Deng, J., Liu, X., Zhou, J., & Li, X., 2019. Antibacterial activity of *Litsea cubeba* essential oil and its mechanism against *Botrytis cinerea*. *RSC Advances*, 9, 28987-28995.