Nghiên cứu tổng hợp màng kháng khuẩn dựa trên nền polyvinyl acohol/Agar kết hợp với dịch chiết lá Trầu không ứng dụng trong bảo quản thực phẩm

Hoàng Ngọc Bích, Nguyễn Thị Thương*

Viện Kĩ 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 màng kháng khuẩn dựa trên sự kết hợp polyvinyl acohol (PVA), Agarose (Agar) và chiết xuất lá Trầu không (BL). Màng composit chứa hàm lượng BL thấp (1%) 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 của PVA. Với hàm lượng chiết BL 1%, độ bóng mờ của màng composit giảm nhiều, trong khi độ truyền quang chỉ giảm không đáng kể. Ngoài ra, việc kết hợp BL vào màng PMA đã cải thiện đáng kể hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh như *Salmonella Typhimurium*. Màng PMA-BL cho thấy ức chế hoàn toàn *Salmonella Typhimurium* sau 6 giờ nuôi cấy ở nồng độ 1% chiết xuất BL. Những kết quả đạt được cho thấy tiềm năng của màng PMA kết hợp với chiết xuất trầu không trong ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm.

® 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 30.12.2018
Được duyệt 15.02.2019
Công bố 26.03.2019

Từ khóa
polyvinyl acohol,
chiết xuất trầu không,
màng kháng khuẩn,
Salmonella Typhimurium

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. Polyvinyl alcol (PVA) là một polymer tổng hợp, ưa nước, có khả năng tương thích sinh học và có khả năng phân hủy sinh học. Dựa trên những tính chất như dễ tạo màng, nhũ hóa, truyền qua, cản oxi và kháng hóa học, PVA được sử dụng rộng rãi trong bao bì giấy, keo dán, dụng cụ y học, chất biến tính[1–4]. Tuy nhiên, nhiều nhóm hydroxyl trong mạch phân tử làm cho PVA nhạy với các phân tử nước, điều này đã giới hạn nhiều tính chất của PVA, giới hạn ứng dụng của chúng trong nhiều lĩnh vực. Như những báo cáo trước, những nhược điểm này được giải quyết bằng cách trộn với những polymer tự nhiên phù hợp. Hai loại polysaccharide tự nhiên là agar và carrageenan đã được phối trộn với PVA nhằm cải thiện tính chất cơ lí của màng PVA [1,5,6]. Những polysaccharide này đã tăng độ bền kéo và độ dãn dài tại điểm đứt của màng PVA. Agar thì cải thiện độ dãn dài trong khi carrageenan cải thiện độ bền kéo của màng PVA. Những kết quả này còn cho thấy độ trương của màng PVA tăng khi nồng độ của các polysaccharide này tăng. Tuy nhiên, nhược điểm khi kết hợp màng PVA với agar là làm cho các vi sinh vật tấn công dễ dàng vào mạch PVA, đặc biệt trong môi trường độ ẩm cao. Gần đây, một số nghiên cứu đã và đang được thực hiện để phát triển bao bì hoạt tính dựa trên nền PVA kết hợp với các hợp chất hoạt tính như lysozyme, chitosan[7,8], chiết xuất hạt trái nho[9], chiết xuất cây đại hoàng và tinh dầu quế, natamycin, vanillin, axit sorbic và enterocins[2,10-12]. Bên cạnh đó, những hợp chất tự nhiên như tác nhân kháng khuẩn và kháng oxi hóa cũng có thể được thêm vào màng PVA để kéo dài thời gian bảo quản của thịt bò, quả bơ và cà chua bi. Mặc dù rất nhiều nghiên cứu trên bao bì hoạt tính PVA nhằm cải thiện tính cản khí, cản nước, độ trương, tính chất cơ và hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxi hóa. Tuy nhiên so với chitosan, PVA có rất ít nghiên cứu kết hợp với chiết xuất thiên nhiên dựa trên độ tan trong nước nhiều, gây giảm hoạt tính kháng khuẩn của màng hoạt tính trên nền PVA[2,8,9,12-14].

Nghiên cứu này tổng hợp màng composit có thể ăn được dựa trên sự kết hợp của polyvinyl acohol (PVA), agarose

(Agar) 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 dựa trên hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư và kháng oxi hóa[15-17]. Một số báo cáo trước cho thấy rằng 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 cho thấy khả năng kháng khuẩn chống lại các khuẩn gam dương (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes)* và các khuẩn gam âm bacteria *(Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Salmonella enteridiidis, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa)*[16]. Như vậy, việc kết hợp tinh dầu Trầu 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 cho khuynh hướng phát triển của màng thực phẩm hoạt tính.

2 Thực nghiệm

2.1 Nguyên liệu

Poly (vinyl alcohol) (M=160,000g/mol) với độ hòa tan 86.5 – 89%, sản phẩm thuộc Công ty HIMEDIA, xuất xứ Ấn Độ. Trầu không sau khi thu mua được rửa sạch, cắt nhỏ và phơi khô. Sau khi phơi khô, lá Trầu 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^{o}C để tạo thành cao chiết Trầu.

2.2 Chế tạo màng kháng khuẩn

Dung dịch PVA (5%, w/v) được hòa tan vào trong 100ml nước cất, dưới điều kiện khuấy từ ở tốc độ 800 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch Agar (2.5%, w/v) được hòa tan vào trong 100ml nước cất, dưới tốc độ khuấy từ 800 vòng/phút ở 100^{o}C cho đến khi Agar tan hoàn toàn. Sau khi PVA và Agar được hòa tan hoàn toàn, hai dung dịch sẽ được trộn lại với và khuấy trong vòng 1 giờ, chiết xuất Trầu không được thêm vào dung dịch polymer ở các nồng độ 1% (v/v) và được khuấy trong 1 giờ trong điều kiện nhiệt độ 50^{o}C. Các dung dịch chứa polymer và chiết xuất sau khi đồng nhất được li tâm trong 1 phút để loại bỏ cặn và bọt khí trước khi đổ màng. Màng sau khi được chế tạo bằng phương pháp casting trên đĩa pertri có kích thước 12cm x 12cm, sấy khô ở nhiệt độ 45^{o}C trong 48 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. Aeginosa, S.subtilis*) đã nuôi cấy 12h vào ống nghiệm. Ống nghiệm được ủ ở nhiệt độ phòng. Lấy mẫu theo thời gian (0h, 6h, 24h) 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:

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

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

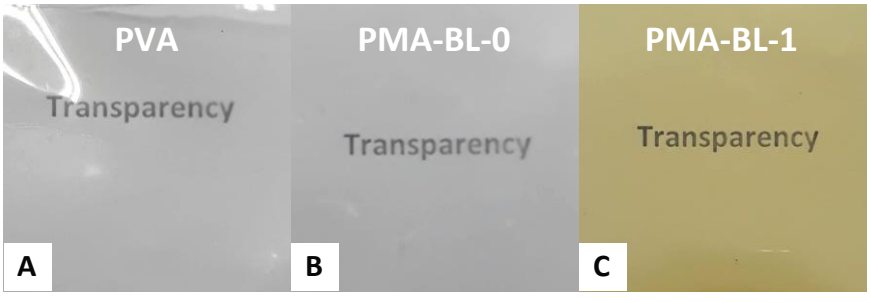
V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i: độ pha loãng tương ứng.

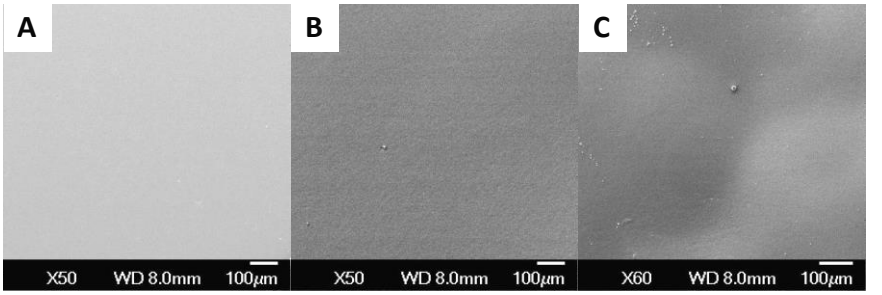
3 Kết quả và biện luận

3.1 Sự phân tán của chiết Trầu không trong màng composit

Ảnh thực của màng PVA cho thấy màu trắng trong, sáng bóng và không có vết nứt, trong khi màng PMA thì có màu trắng trong và độ sáng bóng không bằng; màng PMA kết hợp với cao chiết có màu nâu sáng và trong. Về bề ngoài, màng composit ít sáng hơn so với màng PVA ban đầu. Theo kết quả phân tích SEM, bề mặt màng PMA trở nên tối màu hơn so với PVA và xù xì khi kết hợp BL 1% vào trong màng. Tuy nhiên, bề mặt màng đồng nhất và không có khuyết tật lớn khi kết hợp dịch chiết BL vào trong màng. Điều này chứng tỏ có sự tương hợp tốt giữa mạch của PVA, Agar và BL ở hàm lượng BL 1% [1,6,8,18].



Hình 1 Hình ảnh của màng PVA (A), PMA-BL-0% (B), PMA-BL-1% (C)



Hình 2. Ảnh SEM của màng PVA (a), PMA-BL-0% (b), PMA-BL-1% (c)

3.2 Tính chất quang của màng composit

Sự truyền ánh sáng qua màng là một trong những yếu tố gây ra quá trình oxi 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 (Bảng 1). Kết quả cho thấy, màng PVA cho độ truyền quang cao hơn của màng composit. Giá trị độ truyền quang của màng PVA, PMA và màng PMA kết hợp với BL 1% tương ứng là 91.9%; 90,5% và 82.3%. Những kết quả đạt được cho thấy khả năng cản sáng rất tốt của màng PMA kết hợp với BL. Kết quả này có thể dựa vào sự tương tác của mạch PVA và Agar với các thành phần phenolic của chiết[2,10,12]. Tuy nhiên, màng PVA khi kết hợp với Agar thì độ mờ tăng, do đặc tính lưu biến của các phân tử Agar[19]. Nhưng khi kết hợp với dịch chiết thì độ mờ lại giảm có thể bị ảnh hưởng bởi sự sắp xếp lại cấu trúc polymer[20]. Điều này có thể chứng tỏ ảnh hưởng của quá trình khâu mạng hình thành từ liên kết hydrogen giữa các hợp chất phenolic[17].

Bảng 1 Thông số độ truyền quang và độ mờ của màng PVA, PMA-BL-0%, PMA-BL-1%.

Tính chất	PVA	PMA-BL-0	PMA-BL-1
Độ truyền quang(%)	91.9±0.09	90.5±0.17	82.3±0.38
Độ mờ (%)	1.6±0.23	42.4±0.91	12.6±0.42

3.3 Tính chất cơ lí của màng composit

Tính chất cơ lí, độ tan, độ trương của màng có thể phản ánh được sự liên kết giữa các phân tử polymer trong màng và trật tự sắp xếp được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả cho thấy màng PVA có tính chất cơ lí tốt nhưng với đặc tính ưa nước khiến chúng tan hoàn toàn trong nước dẫn đến độ tan là 100% và độ trương không có giá trị[5,8,21]. Đối với màng PMA và PMA kết hợp với dịch chiết BL thì tính chất cơ lí giảm, độ tan và độ trương cũng giảm. Điều này có thể chứng tỏ rằng khi độ tan và độ trương giảm thì các liên kết của phân tử Agar với PVA khiến đặc tính ưa nước của màng giảm xuống. Do tính lưu biến của Agar mà khiến cho màng composit có độ dãn dài và điểm đứt giảm[1,10,19].

Bảng 2 Thông số độ tan, độ trương, độ dãn dài và điểm đứt của màng PVA, PMA-BL-0%, PMA-BL-1%.

Tính chất	PVA	PMA-BL-0	PMA-BL-1
Độ tan (%)	100±0.00	90.3±0.83	88.9±0.50
Độ trương (%)	0±0.00	159±10.01	71.3±7.65
Độ dãn dài (MPa)	76.8±2.77	23.9±0.52	13.66±0.64
Điểm đứt (%)	249.4±14.44	65.9±3.79	117.8±3.97

3.4 Hoạt tính kháng khuẩn của màng composit

Hoạt tính kháng khuẩn của màng PMA kết hợp với BL chống lại *Salmonella Typhimurium* và số lượng colonies được ghi nhận sau 0, 6 và 24h tiếp xúc (Bảng 3). Trong khi màng PMA cho khả năng kháng khuẩn kém, sự phát triển của *Salmonella Typhimurium* bị ức chế hoàn toàn khi BL được kết hợp vào trong màng PMA sau 6h tiếp xúc. Khả năng kháng khuẩn được tìm thấy chỉ sau 6h tiếp xúc chỉ với hàm lượng BL rất thấp ở 1% dựa trên những hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất trầu không đã được báo cáo trong những nghiên cứu trước[16,19]. 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 rất tốt cho bảo vệ chống lại những vi khuẩn gây bệnh.

Bảng 3 Bảng kết quả định lượng kháng khuẩn của màng PMA-BL-0%, PMA-BL-1%.

Loại vi khuẩn	Cấu trúc màng	Số lượng colonies (CFU/ml)		
		0 h	6 h	24 h
Salmonella Typhimurium	PMA-BL-0	$1.7x10^7$	+++++	+++++
	PMA-BL-1	$3x10^7$	-	+++++

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

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, màng kháng khuẩn dựa trên PVA và Agar được tổng hợp thành công bằng việc kết hợp trực tiếp chiết xuất trầu không (BL), như một nguồn polyphenolic tự nhiên vào trong mạch chitosan. Ở nồng độ BL 1% cho thấy sự phân tán đồng đều của chiết trong màng composit. Khả năng kháng khuẩn chống lại *Salmonella Typhimurium* được tìm thấy trong màng PMA. Những kết quả thu được cho

thấy rằng màng PMA kết hợp với chiết xuất trầu 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. C. Chenwei *et al.*, "Physicochemical, microstructural, antioxidant and antimicrobial properties of active packaging films based on poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposite incorporated with tea polyphenols," *Progress in Organic Coatings*, vol. 123, pp. 176–184, Oct. 2018.
2. F. Debiagi, R. K. T. Kobayashi, G. Nakazato, L. A. Panagio, and S. Mali, "Biodegradable active packaging based on cassava bagasse, polyvinyl alcohol and essential oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 52, pp. 664–670, Jan. 2014.
3. H. Dai, Y. Huang, and H. Huang, "Eco-friendly polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose hydrogels reinforced with graphene oxide and bentonite for enhanced adsorption of methylene blue," *Carbohydrate Polymers*, vol. 185, pp. 1–11, Apr. 2018.
4. V. A. Pereira, I. N. Q. de Arruda, and R. Stefani, "Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging," *Food Hydrocolloids*, vol. 43, no. 3, pp. 180–188, Jan. 2015.
5. Z. Sekhavat Pour, P. Makvandi, and M. Ghaemy, "Performance properties and antibacterial activity of crosslinked films of quaternary ammonium modified starch and poly(vinyl alcohol)," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 80, pp. 596–604, Sep. 2015.
6. B. Liu, H. Xu, H. Zhao, W. Liu, L. Zhao, and Y. Li, "Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications," *Carbohydrate Polymers*, vol. 157, pp. 842–849, Feb. 2017.
7. A. B. Perumal, P. S. Sellamuthu, R. B. Nambiar, and E. R. Sadiku, "Development of polyvinyl alcohol/chitosan bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals isolated from rice straw," *Applied Surface Science*, vol. 449, pp. 591–602, Aug. 2018.
8. Q. Yu, Y. Song, X. Shi, C. Xu, and Y. Bin, "Preparation and properties of chitosan derivative/poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde," *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, no. 1, pp. 465–470, Feb. 2011.
9. A. A. Lo'ay and H. D. Dawood, "Active chitosan/PVA with ascorbic acid and berry quality of 'Superior seedless' grapes," *Scientia Horticulturae*, vol. 224, pp. 286–292, Oct. 2017.
10. I. Choi, J. Y. Lee, M. Lacroix, and J. Han, "Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato," *Food Chemistry*, vol. 218. pp. 122–128, 2017.
11. S. R. Kanatt, M. S. Rao, S. P. Chawla, and A. Sharma, "Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts," *Food Hydrocolloids*, vol. 29, no. 2, pp. 290–297, Dec. 2012.
12. P. Wen, D. H. Zhu, H. Wu, M. H. Zong, Y. R. Jing, and S. Y. Han, "Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging," *Food Control*, vol. 59. pp. 366–376, 2016.
13. W. Yang *et al.*, "Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles," *Carbohydrate Polymers*, vol. 181. pp. 275–284, 2018.
14. Y. Liu, S. Wang, W. Lan, and W. Qin, "Development of ultrasound treated polyvinyl alcohol/tea polyphenol composite films and their physicochemical properties," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 51, pp. 386–394, Mar. 2019.
15. "1989-Anticarcinogenic effect of betel leaf extract against tobaccos.pdf." .
16. 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.
17. J. S. Rathee, B. S. Patro, S. Mula, S. Gamre, and S. Chattopadhyay, "Antioxidant activity of piper betel leaf extract and its constituents," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 24. pp. 9046–9054, 2006.
18. S. Singh, K. K. Gaikwad, and Y. S. Lee, "Antimicrobial and antioxidant properties of polyvinyl alcohol bio composite films containing seaweed extracted cellulose nano-crystal and basil leaves extract," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 107. pp. 1879–1887, 2018.
19. X. Yang, Z. Zhu, Q. Liu, X. Chen, and M. Ma, "Effects of PVA, agar contents, and irradiation doses on properties of

PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by γ-irradiation followed by freeze-thawing," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 77, no. 8. pp. 954–960, 2008.
20. R. Yadav and B. Kandasubramanian, "Egg albumin PVA hybrid membranes for antibacterial application," *Materials Letters*, vol. 110, pp. 130–133, Nov. 2013.
21. H. Adeli, M. T. Khorasani, and M. Parvazinia, "Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 122, pp. 238–254, Feb. 2019.

Synthesis and characterization of antibacterial membranes based on Polyvinyl acohol/agar incorporated with betel leaf extract for application in food packaging

Ngoc Bich Hoang, Thi Thuong Nguyen*

Nguyen Tat Thanh Institute of Hi-Technology, Nguyen Tat Thanh University
* nthithuong@ntt.edu.vn

Abstract The aim of this study is to successful synthesis of antibacterial membranes based on a combination of polyvinyl acohol (PVA), Agarose (Agar) and betel leaf extract (BL). The composite membranes containing low BL content of 1% was prepared via the simple casting method. The results obtained from SEM analysis showed the uniform dispersion of BL into PVA matrix. It can be found a decrease in the luminous transmittance of composite film while the haze percentage increased compared with bare PVA film. In addition, the inhibition against *Salmonella Typhimurium* of PMA membranes has significantly improved with only the corporated 1% BL. The result exhibited that PMA-BL film can inihibite *Salmonella Typhimurium* after 6 hours exposure with the addition of 1% BL content. Hence, the obtained results indicated the promising application of PMA membrane combined with betel extract in the food packaging.

Keywords Biocomposite membrane, Betel leaf extract, Food packaging, *Salmonella Typhimurium*.