

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA CHITOSAN VỚI CALCIUM GLUCONATE, POLYVINYL ALCOHOL ĐẾN NẤM MỐC GÂY HẠI PHẦN LẬP TỪ TRÁI DÂU TÂY THUỶ CANH

NGUYỄN ĐỨC VƯỢNG¹, TÔ THỊ XUÂN², HỨA HUỖNH MINH THẢO¹, DƯƠNG QUỐC ĐẠT¹,
NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

² Ban Quản lý An toàn Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

nguyenducvuong@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Quả dâu tây (*Fragaria x ananassa*) là loại trái cây vỏ mỏng, rất dễ hư hỏng do bị mốc, mất nước, mất cấu trúc bởi quá trình trao đổi chất vẫn diễn ra sau thu hoạch. Nghiên cứu này tập trung phân lập và xác định các chủng nấm mốc gây hư hỏng trái dâu tây được trồng bằng phương pháp thủy canh; và khảo sát khả năng kháng các chủng nấm mốc này của dung dịch chitosan (CTS), và CTS kết hợp với calcium gluconate (CaGlu) và polyvinyl alcohol (PVA). Kết quả phân lập và định danh cho thấy có 6 chủng nấm mốc gây hư hỏng dâu tây được trồng theo phương pháp thủy canh bao gồm *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium chermesinum* và *Rhizopus stolonifer*. Kết quả khảo sát khả năng kháng nấm cho thấy CTS 1% w/v có khả năng kháng 6 chủng nấm mốc nêu trên với hiệu suất từ 53,54% đến 77%. Khi bổ sung CaGlu 0,5% w/v vào CTS 1%, hiệu suất kháng 6 chủng nấm mốc tăng lên tương ứng từ 73,96% đến 93,33%. Hiệu suất này đạt cao nhất (từ 79,38% đến 96,88%) khi bổ sung PVA 0,39% w/v vào CTS 1%. Kết quả này góp phần cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc phát triển màng bảo quản trái dâu tây được trồng theo kỹ thuật thủy canh, nhằm nâng cao chất lượng của dâu tây sau thu hoạch và nâng cao khả năng bảo quản trong quá trình lưu trữ, vận chuyển.

Từ khóa: calcium gluconate (CaGlu), chitosan (CTS), dâu tây thủy canh, kháng nấm mốc, polyvinyl alcohol (PVA)

ANTIFUNGAL EFFECTS OF CHITOSAN COMBINED WITH CALCIUM GLUCONATE, POLYVINYL ALCOHOL TOWARDS HYDROPONIC STRAWBERRY PATHOGENS

Abstract. The strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) is a thin-skinned fruit that is easy to spoil due to mold, dehydration, and structural loss because of continuous metabolism processes even after harvesting. This study focused on isolating and identifying fungal pathogens of hydroponic strawberry fruit and investigating the antifungal effect of chitosan solution (CTS), and CTS in combination with calcium gluconate (CaGlu) and polyvinyl alcohol (PVA) towards the identified pathogens. Six strains of pathogens were isolated and identified were *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium chermesinum*, and *Rhizopus stolonifer*. In addition, the results have shown a high antifungal effect of CTS 1% (w/v) to the 6 fungal strains with efficiency values between 53.54% and 77%. Higher effects were observed in the case of CTS 1% combined with CaGlu 0.5% (w/v) as efficiency the was increased from 73.96 to 93.33% and highest effect was obtained with the solution containing all the 3 agents: CTS 1%, CaGlu 0.5%, and PVA 0.39% (w/v) (up to 79.38 - 96.88% efficiency). This result provides an important scientific basis for the development of preserving membrane for hydroponic strawberry in order to improve the fruit quality after harvesting and during storage and transportation.

Key worlds. Antifungal activity, calcium gluconate (CaGlu), chitosan (CTS), hydroponic strawberry, polyvinyl alcohol (PVA)

1. GIỚI THIỆU

Trái dâu tây (*Fragaria x ananassa*) do đặc tính nhiều nước và vỏ mỏng, nên rất dễ bị hư hỏng sau thu hoạch, và có thời gian bảo quản ngắn. Các hiện tượng hư hỏng trái dâu tây thường gặp là bị mất nước, mất cấu trúc và bị nhiễm các loại mốc. Trong đó, các loại nấm mốc phổ biến gây phân hủy và hư hỏng ở trái lần lượt là *Botrytis cinerea*, followed by *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium*

spp. [1]. Phương pháp phổ biến để duy trì chất lượng và kiểm soát quá trình phân hủy của quả dâu tây là làm mát nhanh trái dâu sau khi thu hoạch và tiếp đó bảo quản ở nhiệt độ thấp. Nhiệt độ bảo quản tại các kho lạnh (0 – 4°C) giúp dâu tây tươi bảo quản được khoảng 5 ngày. Để tăng thời gian bảo quản dâu tây, việc sử dụng nhiệt độ thấp kết hợp với việc kiểm soát hoặc điều chỉnh nồng độ của oxy và carbon dioxide đã được cải biến và nghiên cứu [2]. Tuy nhiên, hiệu quả kiểm soát nhiệt độ trong quá trình vận chuyển và bảo quản dâu tây rất khó, vì vậy đã có một số các biện pháp bảo quản khác được nghiên cứu. Sau thu hoạch, sự hư hỏng quả dâu tây cũng có thể được kiểm soát bởi các thuốc diệt nấm [3]. Tuy nhiên, dư lượng thuốc diệt nấm sau thu hoạch ảnh hưởng lớn đến tính an toàn thực phẩm [4]. Do đó, các nhà khoa học đã nghiên cứu và công bố kết quả về khả năng thay thế các chất diệt nấm hóa học bằng các sản phẩm tự nhiên hoặc tăng cường các chất bảo vệ tự nhiên để kiểm soát sự hư hỏng và kéo dài thời gian bảo quản của trái cây [5]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, lớp phủ chitosan (CTS) có khả năng kéo dài thời gian bảo quản và kiểm soát sự phân rã của dâu tây, cà chua, đào, quả lê, kiwi, vải, táo và nhãn [6-8]. Đồng thời, CTS cũng được chứng minh là có khả năng làm chậm sự chín của dâu tây, cà chua, táo, lê, đào, vải, cam và chanh [6, 9-10]. CTS nhận được sự quan tâm lớn do tính tương thích sinh học của nó với các thành phần bảo quản khác, khả năng dễ phân hủy sinh học và kháng vi sinh vật của nó [11]. Theo Lê Nguyễn Đoàn Duy và cộng sự (2014), dung dịch chitosan 1% (w/v) ức chế nấm mốc *Colletotrichum gloeosporioides* trên môi trường Potato Detrose Agar (PDA). Kết quả còn chỉ ra rằng chitosan có khả năng ức chế nấm mốc trên trái xoài sau khi gây nhiễm nhân tạo [12]. Mohamed và Entsar (2009) đã chứng minh rằng các CTS với nồng độ 2000 và 4000 mg/L và khối lượng phân tử $5,7 \times 10^4$ g/mol có tác dụng ức chế mạnh nhất sự phát triển của nấm *Botrytis cinerea* và giảm thiểu tốt nhất sự phân hủy cà chua do mốc sau thu hoạch trong các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* [13]. Pilar Hernandez-Munoz và cộng sự (2008) đã cho thấy dâu tây được phủ bằng chitosan 1,5% hoặc hỗn hợp chitosan 1%-calcium gluconate (CaGlu) 0,5% có tác dụng ức chế sự phân hủy quả dâu tây bởi nấm trong 1 tuần ở điều kiện 10°C và $70 \pm 5\%$ RH trong một tuần. Ngoài ra, lớp phủ chitosan làm giảm hoạt động hô hấp, do đó làm chậm quá trình chín và tiến trình phân hủy quả do lão hóa [14].

Trong những nghiên cứu gần đây về bảo quản trái cây, CTS thường được kết hợp với các polymer khác để giảm chi phí và tăng hiệu quả bảo quản nông sản nói chung, cũng như làm tăng đặc tính kháng vi sinh vật [15]. Polyvinyl alcohol (PVA) là polymer tổng hợp có đặc tính tạo màng tốt, có khả năng phân hủy sinh học, không độc hại, không gây ung thư. Do các tác dụng sinh học tốt của chitosan và PVA, sự kết hợp của chitosan và PVA có thể có tác dụng có lợi trên các đặc tính của màng phủ khi pha trộn [16]. Sweetie R. Kanatt và cộng sự (2012) đã nghiên cứu về các màng hoạt tính được điều chế từ chitosan và PVA có chứa chiết xuất bạc hà (ME), và chiết xuất vỏ quả lựu (PE). Hai loại màng này có khả năng bảo vệ sản phẩm chống lại ảnh hưởng của tia UV, có độ bền kéo cao, có đặc tính chống oxy hóa và có khả năng kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus* và *Bacillus cereus* [17].

Để kéo dài thời gian bảo quản, giảm thiểu sự biến đổi chất lượng do nấm mốc, việc nghiên cứu khả năng kháng nấm mốc trên trái dâu tây là cần thiết, làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu khoa học trong bảo quản trái cây. Đề tài này nghiên cứu phân lập và định danh nấm mốc gây hư hỏng trái dâu tây, và khảo sát khả năng kháng nấm mốc phân lập được của CTS kết hợp với hai hoạt chất khác có đặc tính tốt là polyvinyl alcohol và calcium gluconate là thiết thực và góp phần vào giải quyết vấn đề nêu trên

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dâu tây được trồng theo phương pháp công nghệ cao (thủy canh) tại Vườn dâu Công nghệ cao Gấu Bự (Số 10 Lộc Quý, Xuân Thọ, Thành phố Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam). Ngay sau khi thu hoạch, trái dâu tây có 30-50% màu đỏ, kích cỡ đồng đều, chín đều, không sâu bệnh, không dập nát được vận chuyển đến TP.HCM trong vòng 12 giờ và được bảo quản trong điều kiện $10 \pm 2^\circ\text{C}$.

Chitosan được cung cấp bởi Công Ty Cổ Phần Đầu Tư Thương Mại Dịch Vụ Tin Cây (Số 4, Đường số 3, Khu Đô Thị Vạn Phúc, Phường Hiệp Bình Phước, Quận Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam), Chitosan có dạng miếng mảnh, kích thước khác nhau, màu sắc trắng ngà, độ ẩm 11,96 %, độ deacetyl hóa 98%, độ tan 99,98 % trong dung dịch axit axetic, khối lượng phân tử 50 - 100 kD.

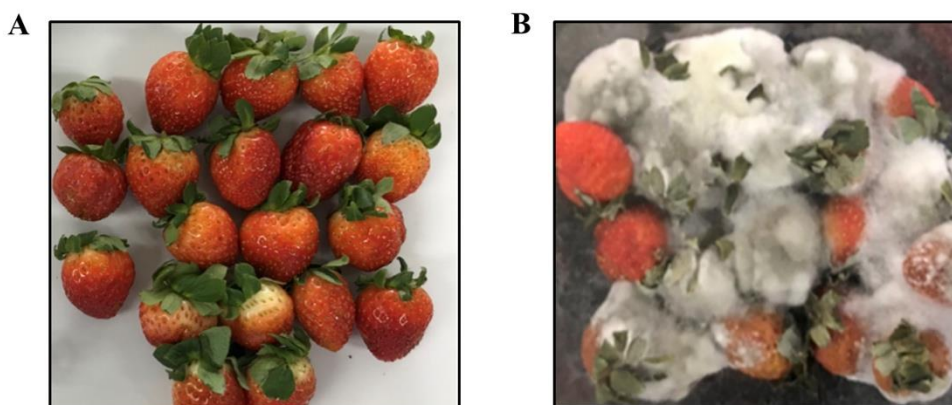
Calcium gluconate được cung cấp bởi Vadhani Ind Est. LBS Mang, Mumbai – 400086, Ấn Độ. Calcium gluconate có dạng bột, màu trắng, độ tinh khiết 98,5%.

Polyvinyl alcohol có dạng bột, màu trắng, độ tinh khiết 99%, khối lượng phân tử 40.000 – 45.000 kD. Xuất xứ Malaysia. Polyvinyl alcohol được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Hóa Mỹ Phẩm 3C, 127 Bạch Đằng, phường 2, Quận Tân Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh nấm mốc từ trái dâu

Các mẫu dâu tây nhiễm nấm mốc được thu nhận (Hình 1) sau quá trình bảo quản tại $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và tiến hành phân lập theo phương pháp pha loãng thông qua cây chuyền nhiều lần trên môi trường PGA được trình bày trong báo cáo của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (2000) [18]. Mẫu dâu tây (10g) bị nhiễm mốc được nghiền nát và pha trong 90 ml nước muối sinh lý vô trùng, sau đó tiếp tục pha loãng mẫu ở nồng độ 10^{-5} để cấy trang trong đĩa Petri có chứa môi trường PGA. Đĩa Petri được ủ tại điều kiện nhiệt độ phòng, trong 7 ngày đến khi xuất hiện các khuẩn lạc nấm gây bệnh. Các mẫu nấm gây bệnh tiếp tục được cấy chuyền nhiều lần trên môi trường thạch PGA để thu được dòng thuần chủng. Các chủng nấm mốc được cấy chuyền trên ống thạch nghiêng chứa môi trường PGA và lưu trữ trong điều kiện 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: Mẫu trái dâu tây bị nhiễm nấm mốc gây bệnh. (A) Trái dâu tây khô mạnh; (B) Trái dâu tây bị nhiễm mốc.

Các chủng nấm mốc được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, giải trình tự đoạn gen 28S-rRNA bởi Công ty TNHH DV và TM Nam Khoa (793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, Quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam). DAN sau khi được tách chiết, được thực hiện PCR với mỗi đặc hiệu vùng 28s và giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 28S-rRNA của các nấm mốc có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để định danh chủng nấm mốc.

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng các loại nấm mốc gây bệnh hư hỏng dâu tây thủy canh trong điều kiện *in vitro* bằng dung dịch CTS, CTS+PVA, CTS+CaGlu

Khả năng đối kháng của các dung dịch chitosan và chitosan có bổ sung các hóa chất calcium gluconate và polyvinyl alcohol được kiểm tra theo phương pháp của Perrucci và cộng sự (1994) [19]. Các chủng nấm mốc được cấy trên thạch đĩa có chứa môi trường PGA được trộn với các dung dịch chitosan CTS 1% (w/v), CTS 1% kết hợp với PVA 0,39% (w/v) và CTS 1% kết hợp CaGlu 0,5% (w/v) theo tỷ lệ 1 - 4; mẫu đối chứng (Mẫu ĐC) sử dụng nước cất vô trùng thay cho dung dịch chitosan. Các đĩa Petri được ủ trong nhiệt độ 30°C cho đến khi tơ nấm của mẫu đối chứng phát triển đến vành đĩa Petri. Hiệu suất kháng nấm mốc được xác định theo công thức (1).

$$H = (D_0 - D_t) / D_0 * 100\% \quad (1)$$

Trong đó, H là hiệu suất kháng nấm (%), D_t là đường kính tơ nấm của mẫu thử nghiệm (mm) và D_0 là đường kính tơ nấm của mẫu đối chứng (mm).

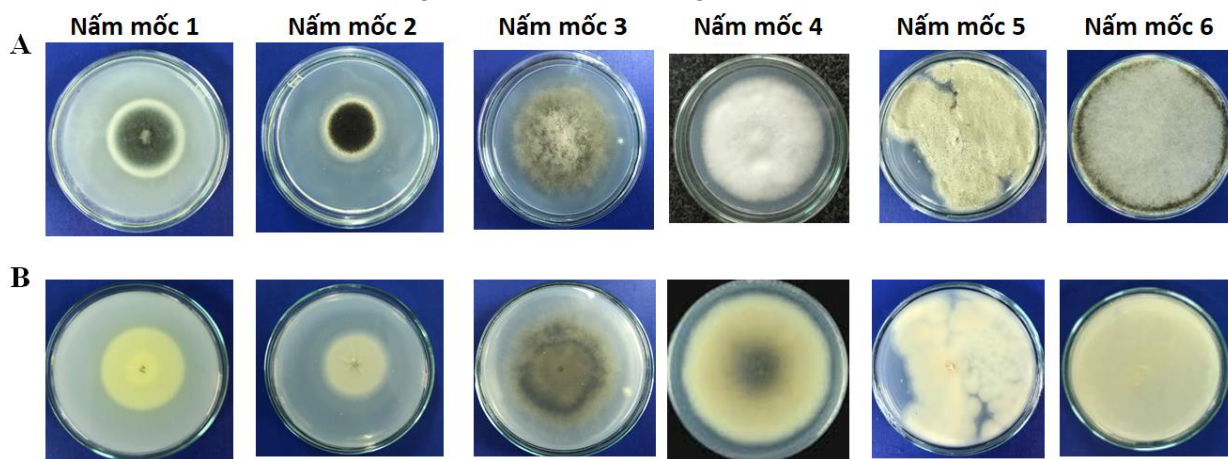
2.2.3. Phương pháp thu thập và xử lý kết quả

Giá trị kết quả của các thí nghiệm là trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ trên Microsoft Excel 2013 và được xử lý thống kê bằng phương pháp ANOVA bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và định danh nấm mốc

Các nấm mốc gây bệnh trên trái dầu tây được phân lập trên môi trường PGA và tiến hành làm thuần sau nhiều lần. Hình dạng khuẩn lạc của các chủng nấm mốc phân lập được thể hiện trong Hình 2. Căn cứ vào sự khác nhau của đặc điểm hình dạng các khuẩn lạc, 6 chủng nấm mốc đã được xác định.



Hình 2: Hình dạng khuẩn lạc của các chủng nấm mốc phân lập được từ trái dầu tây hư hỏng. (A) Mặt trên khuẩn lạc; (B) Mặt dưới khuẩn lạc.

Các chủng nấm mốc gây bệnh trên trái dầu tây sau khi được phân lập sẽ được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Trình tự 28S rRNA của các chủng nấm mốc được giải trình tự và so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả cho thấy, gen mã hóa trình tự 28S rRNA của các chủng nấm mốc 1 đến nấm mốc 6 có sự tương đồng tương ứng với các chủng nấm mốc *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium chermesinum*, *Rhizopus stolonifer* (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả định danh nấm mốc theo phương pháp sinh học phân tử giải trình tự gen 28S rRNA

Mẫu	Đòng tương đồng	Mức độ tương đồng (%)	Chiều dài đoạn gen (b)	Nguồn dữ liệu trên ngân hàng dữ liệu
Nấm mốc 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	1716	KR023997.1
Nấm mốc 2	<i>Aspergillus niger</i>	100	1681	MG675233.1
Nấm mốc 3	<i>Botrytis cinerea</i>	100	1038	KR055052.1
Nấm mốc 4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99.34	1655	A301977.1
Nấm mốc 5	<i>Penicillium chermesinum</i>	99.87	1408	AY742693.1
Nấm mốc 6	<i>Rhizopus stolonifer</i>	100	651	JQ606829.1

Kết hợp với hình ảnh phát triển các chủng nấm mốc sau khi phân lập (Hình 2), đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm mốc được trình bày trong Bảng 2 cùng với kết luận định danh tên chủng nấm mốc tương ứng.

Bảng 2: Đặc điểm khuẩn lạc và tên khoa học tương đồng của các chủng nấm mốc gây bệnh phân lập được trên trái dầu tây.

Mẫu	Đặc điểm hình thái	Tên chủng định danh
Nấm mốc 1	Tơ nấm bám sâu bề mặt cơ chất, màu trắng. Bào tử màu xanh xám trên đầu các khuẩn ty khí sinh. Hình thành sắc tố có màu vàng nhạt.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Nấm mốc 2	Tơ nấm có màu trắng, hình thành bào tử đen trên đầu khuẩn ty khí sinh, không hình thành sắc tố có màu trong môi trường nuôi cấy PGA.	<i>Aspergillus niger</i>

Nấm mốc 3	Tơ nấm có dạng sợi bông, màu xám, nhiều tơ khí sinh, khi tơ nấm già màu sắc chuyển đậm hơn, tiết sắc tố sẫm màu.	<i>Botrytis cinerea</i>
Nấm mốc 4	Tơ nấm có dạng sợi bông, màu trắng, nhiều tơ khí sinh, khi tơ nấm già hình thành các sắc tố màu xám đen.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Nấm mốc 5	Tơ nấm có màu trắng, khi già chuyển màu vàng nhạt, bào tử hình thành ở đầu khuẩn ty khí sinh, có màu vàng nhạt, không hình thành sắc tố có màu trên môi trường nuôi cấy PGA.	<i>Penicillium chermesinum</i>
Nấm mốc 6	Tơ nấm xám nhạt, dạng bông, nhiều tơ khí sinh, không hình thành sắc tố có màu.	<i>Rhizopus stolonifer</i>

3.2. Kết quả kháng nấm của dung dịch chitosan, chitosan – calcium gluconate, chitosan – polyvinyl alcohol

Hiệu quả đối kháng của các dung dịch chitosan (CTS), chitosan kết hợp calcium gluconate (CTS+CaGlu), chitosan kết hợp với polyvinyl alcohol (CTS+PVA) lên các chủng nấm mốc gây bệnh trên dây tây được kiểm tra. Kết quả kháng nấm của các dung dịch xử lý lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm được thể hiện trong hình 3 và bảng 2. Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng của các dung dịch chitosan trên 6 chủng nấm mốc gây bệnh cho thấy cả 3 dung dịch chitosan đều có khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm. Khi bổ sung thêm các hợp chất calcium gluconate và polyvinyl alcohol vào dung dịch chitosan, hiệu quả ức chế tơ nấm tăng lên đáng kể và có sự khác biệt có ý nghĩa khi thống kê ở mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$). Kết quả thực nghiệm cho thấy dung dịch CTS 1% ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm của *Rhizopus stolonifer* là tốt nhất với hiệu suất kháng nấm là $77 \pm 1,32\%$ và thấp nhất là đối với nấm mốc *Aspergillus niger* với hiệu suất kháng nấm là $50,63 \pm 0,63\%$ (Hình 4). Chitosan có khả năng ức chế các loại nấm mốc, kháng khuẩn là do nhóm amino tích điện dương của nó tương tác với màng tế bào vi khuẩn tích điện âm, dẫn đến chảy axit amin, protein và các thành phần nội bào khác của vi sinh vật [20-22]. A El Ghaouth và cộng sự (1992) đã công bố sự ức chế các loại nấm mốc của CTS tăng lên tương ứng với mức độ deacetyl hóa nó. Khi nghiên cứu ở mức độ vi mô cho thấy CTS gây ra sự bào mòn thành tế bào, làm tăng độ dày của thành tế bào, phá vỡ cấu trúc tế bào của nấm, thay đổi hình thái nấm *Botrytis cinerea* và *Rhizopus stolonifer*. Ngoài ra CTS kích thích các hoạt động của chitin deacetylase, một loại enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp của chitosan. Điều này làm cho thành phần chitin trong vách tế bào vách tế bào nấm bị mất cân bằng, làm ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ sợi tơ nấm [23].

Trong nghiên cứu này, ngoài khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Botrytis cinerea* và *Rhizopus stolonifer*, dung dịch CTS còn thể hiện khả năng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* tốt với hiệu quả ức chế đạt $63,13\% \pm 1,65\%$. Sự ức chế nấm *C. gloeosporioides* cũng được công bố trong nghiên cứu của Asgar Ali và cộng sự (2010) với dung dịch chitosan 1% và có hiệu suất ức chế trong sự sản sinh bào tử *Colletotrichum gloeosporioides* khoảng 62% trong môi trường PDA trong 07 ngày ủ mẫu [24] và thấp hơn so với kết quả trong nghiên cứu của Lê Nguyễn Đoàn Duy và cộng sự (2014) là 74,44% trên môi trường PDA sau khi ủ trong 10 ngày [12].

Ngoài ra, kết quả thể hiện trong hình 3 cũng cho thấy việc bổ sung CaGlu hoặc PVA vào dung dịch CTS làm tăng khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm gây bệnh. Trong nghiệm thức bổ sung CaGlu vào dung dịch chitosan, hiệu quả ức chế cao nhất được thể hiện trên nấm mốc *Rhizopus stolonifer* với $93,33 \pm 0,58\%$, kết quả này tương tự như trong nghiệm thức có bổ sung PVA với hiệu quả ức chế đạt được $93,33 \pm 0,58\%$. Hiệu quả ức chế cao nhất khi bổ sung PVA được thể hiện trên nấm *C. gloeosporioides* với $96,88\% \pm 0,63\%$ và đồng thời hiệu quả ức chế trên các loài nấm khác như *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. chermesinum* cũng tăng mạnh trong thử nghiệm bổ sung PVA. Tuy nhiên, trong trường hợp của nấm *Botrytis cinerea* hiệu quả ức chế khi bổ sung CaGlu được ghi nhận cao nhất ($79,38 \pm 0,63\%$) trong 3 nghiệm thức thử nghiệm của chitosan. Trong nghiên cứu của Wisniewski và cộng sự (1995), muối calcium có vai trò quan trọng trong việc ức chế sự hư hỏng sau thu hoạch của táo, đồng thời giúp tăng cường hiệu quả của các chất diệt khuẩn sau thu hoạch. Ngoài ra, sự hiện diện của cation Ca^{2+} cũng gia tăng hiệu quả kiểm soát sinh học của chất đối kháng từ nấm men lên nấm mốc *Botrytis cinerea* [25]. Các cation có khả năng liên kết ngang pectin, do đó sẽ làm cho pectin ít bị suy thoái bởi enzyme từ nấm mốc. Hàm lượng calcium cao gây bất lợi

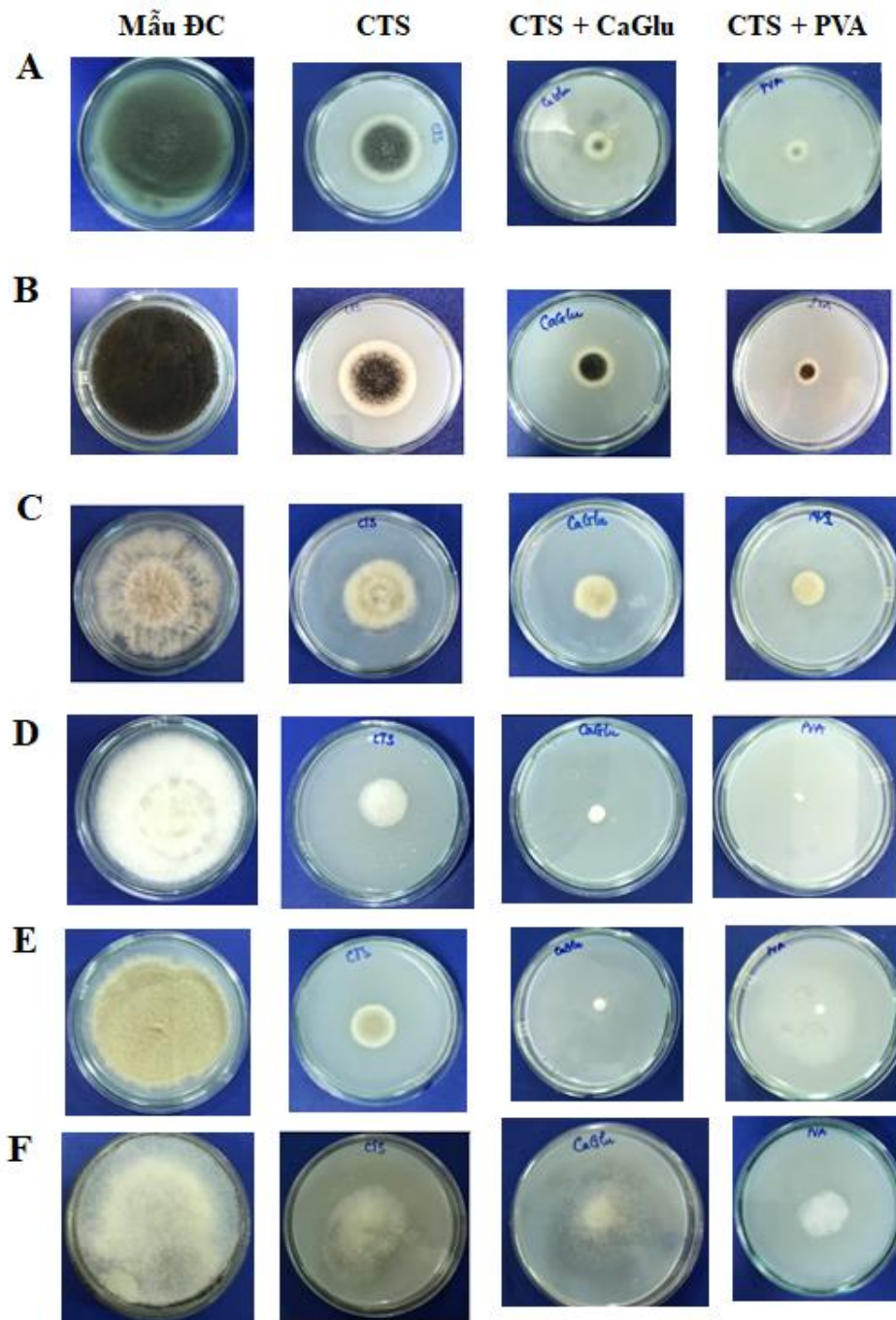
cho quá trình trao đổi chất, tác dụng ức chế sự nảy mầm và sự phát triển ống mầm của bào tử nấm mốc. Trong các tế bào nhân thực, hàm lượng calcium bên trong cao được biết là gây ức chế tăng trưởng, và có thể dẫn đến chết tế bào [26]. Ngoài ra, nồng độ calcium cao ở ngoại bào kết hợp với sự thiếu hụt ATP dẫn đến nồng độ calcium trong men tế bào tăng cao [27], nấm *Botrytis cinerea* và *Penicillium expansum* là bị ức chế do tăng nồng độ ion Ca^{2+} . Trong nghiên cứu của A. R. Biggs và cộng sự (1997) đã cho thấy dung dịch CaGlu ở nồng độ 600mg/L đã ức chế được sự phát triển của nấm mốc *Monilinia fructicola* phân lập từ trái đào trên môi trường PDA [28]. Do vậy, việc chitosan được bổ sung thêm CaGlu cho thấy hiệu quả kháng nấm mốc tốt hơn so với chỉ sử dụng đơn lẻ chitosan.

Bảng 2: Hiệu quả kháng nấm của dung dịch CTS 1% (w/v), CTS 1% kết hợp với PVA 0,39% (w/v) và CTS 1% kết hợp CaGlu 0,5% (w/v) trong điều kiện *in vitro*

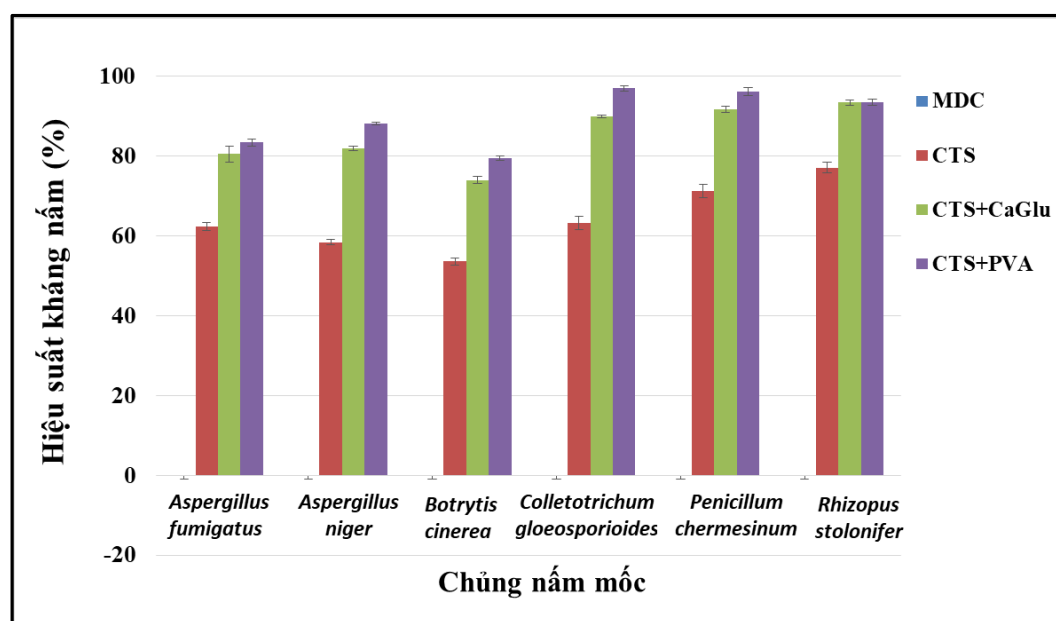
Hiệu quả ức chế sự phát triển tơ nấm (%)	Mẫu ĐC	CTS	CTS+CaGlu	CTS+PVA
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 ^a	62,29 ^b ± 0,95	80,42 ^c ± 1,91	83,33 ^d ± 0,95
<i>Aspergillus niger</i>	0 ^a	50,63 ^b ± 0,63	73,13 ^c ± 0,63	85,83 ^d ± 0,36
<i>Botrytis cinerea</i>	0 ^a	53,54 ^b ± 0,95	79,38 ^c ± 0,63	73,96 ^d ± 0,95
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0 ^a	63,13 ^b ± 1,65	89,79 ^c ± 0,36	96,88 ^d ± 0,63
<i>Penicillium chermesinum</i>	0 ^a	71,25 ^b ± 1,65	91,67 ^c ± 0,72	96,04 ^d ± 0,95
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0 ^a	77,00 ^b ± 1,32	93,33 ^c ± 0,58	93,33 ^c ± 0,76

(Số liệu biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các lần đo, ký hiệu a, b, c biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05)

Bên cạnh đó, theo Bonilla và cộng sự (2013), màng chitosan kết hợp PVA có tác dụng làm giảm số lượng vi sinh vật hiếu khí sau 7 ngày lưu trữ so với mẫu được xử lý với chitosan. Cùng với việc kết hợp chitosan và PVA còn cho thấy hoạt động kháng khuẩn đáng kể ($p < 0,05$) khi ức chế tổng vi sinh vật hiếu khí và coliform so với các mẫu không xử lý hoặc mẫu chỉ xử lý với PVA, việc này cho thấy hiệu quả kháng khuẩn của PVA trong các màng bao sinh học [29]. Ngoài ra, Tripathi và cộng sự (2009) đã chỉ ra rằng, dung dịch chitosan kết hợp PVA có tác dụng ức chế *E. coli*, *B. subtilis* và *S. aureus*, cũng như màng chitosan và PVA còn có thể được sử dụng để kéo dài thời hạn sử dụng thực phẩm [16].



Hình 3: Khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ các chủng nấm mốc gây bệnh trong các môi trường có bổ sung dung dịch CTS 1% (w/v), CTS 1% kết hợp với PVA 0,39% (w/v) và CTS 1% kết hợp CaGlu 0,5% (w/v). (A) *Aspergillus fumigatus*; (B) *Aspergillus niger*; (C) *Botrytis cinerea*; (D) *Colletotrichum gloeosporioides*; (E) *Penicillium chermesinum*; (F) *Rhizopus stolonifer*



Hình 4. So sánh hiệu quả kháng nấm của dung dịch CTS 1% (w/v), CTS 1% kết hợp với PVA 0,39% (w/v) và CTS 1% kết hợp CaGlu 0,5% (w/v) trong điều kiện *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, sáu chủng nấm mốc gây hư hỏng trái dâu tây được nuôi trồng bằng phương pháp thủy canh đã được phân lập. Sáu chủng nấm mốc được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử với các loài tương ứng là *Botrytis cinerea*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* và *Penicillium chermesinum*. Khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm của dung dịch chitosan 1% đã được xác định với hiệu quả $50,63 \pm 0,63\%$ - $77,00 \pm 1,32\%$, tùy theo loài nấm kiểm nghiệm. Hiệu suất kháng nấm tăng lên khi kết hợp CTS 1% cùng PVA 0,39% hoặc CaGlu 0,5%, đạt $73,13 \pm 0,63\%$ - $96,88 \pm 0,63\%$ tùy thuộc chủng nấm. Kết quả này là cơ sở cho việc ứng dụng chitosan trong bảo quản dâu tây và ứng dụng kháng các loại nấm mốc gây hư hỏng trên các trái cây khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. E. Feliziani and G. Romanazzi, *Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management*, Journal of Berry Research **6** (2016), no. 1, 47-63.
- [2]. A. G. Pérez and C. Sanz, *Effect of high-oxygen and high-carbon-dioxide atmospheres on strawberry flavor and other quality traits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry **49** (2001), no. 5, 2370-2375.
- [3]. Y. Aharoni and R. Barkai-Golan, *Pre-harvest fungicide sprays and polyvinyl wraps to control botrytis rot and prolong the post-harvest storage life of strawberries*, Journal of horticultural science **62** (1987), no. 2, 177-181.
- [4]. R. Spotts and L. Cervantes, *Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of botrytis spp., penicillium spp., and mucor piriformis in packinghouses*, Plant disease (USA) (1986).
- [5]. N. Adikaram, A. Brown and T. Swinburne, *Phytoalexin induction as a factor in the protection of capsicum annum l. Fruits against infection by botrytis cinerea pers*, Journal of phytopathology **122** (1988), no. 3, 267-273.
- [6]. J. Du, H. Gemma and S. Iwahori, *Effects of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit*, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **66** (1997), no. 1, 15-22.
- [7]. A. El Ghaouth, J. Arul, R. Ponnampalam and M. Boulet, *Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries*, Journal of food science **56** (1991), no. 6, 1618-1620.

- [8]. A. Ippolito, A. El Ghaouth, C. L. Wilson and M. Wisniewski, *Control of postharvest decay of apple fruit by aureobasidium pullulans and induction of defense responses*, Postharvest Biology and Technology **19** (2000), no. 3, 265-272.
- [9]. A. El Ghaouth, J. Arul, J. Grenier and A. Asselin, *Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits*, Phytopathology **82** (1992), no. 4, 398-402.
- [10]. H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee and S. P. Meyers, *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights*, International journal of food microbiology **74** (2002), no. 1-2, 65-72.
- [11]. R. Tharanathan, *Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future*, Trends in food science & technology **14** (2003), no. 3, 71-78.
- [12]. N. T. Lê Nguyễn Đoàn Duy, K. Tuyền, L. T. Lan and N. C. Hà, *Nghiên cứu ứng dụng chitosan để ức chế nấm colletotrichum gloeosporioides phân lập từ xoài cát hòa lộc bị bệnh thán thư*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ (2014), 154-161.
- [13]. M. E. Badawy and E. I. Rabea, *Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit*, Postharvest Biology and Technology **51** (2009), no. 1, 110-117.
- [14]. P. Hernandez-Munoz, E. Almenar, V. Del Valle, D. Velez and R. Gavara, *Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (fragaria × ananassa) quality during refrigerated storage*, Food Chemistry **110** (2008), no. 2, 428-435.
- [15]. L. Salamanca, L. Cabreta, G. Narveaz and L. de Alba, *Linseed mucilage and chitosan composite films: Preparation, physical, mechanical, and microstructure properties*, Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food2011.
- [16]. S. Tripathi, G. Mehrotra and P. Dutta, *Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-pva film for food packaging applications*, International Journal of Biological Macromolecules **45** (2009), no. 4, 372-376.
- [17]. S. R. Kanatt, M. S. Rao, S. P. Chawla and A. Sharma, *Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts*, Food Hydrocolloids **29** (2012), no. 2, 290-297.
- [18]. N. L. Dũng, N. Đ. Quyên and P. V. Ty, "Giáo trình vi sinh vật học," Trang2000, pp. 301-302.
- [19]. S. Perrucci, F. Mancianti, P. Cioni, G. Flamini, I. Morelli and G. Macchioni, *In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of microsporium canis and microsporium gypseum*, Planta medica **60** (1994), no. 02, 184-186.
- [20]. S. R. Kanatt, M. Rao, S. Chawla and A. Sharma, *Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts*, Food Hydrocolloids **29** (2012), no. 2, 290-297.
- [21]. H. Möller, S. Grelier, P. Pardon and V. Coma, *Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-hpmc-based films*, Journal of agricultural and food chemistry **52** (2004), no. 21, 6585-6591.
- [22]. S. Honary, K. Ghajar, P. Khazaeli and P. Shalchian, *Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan*, Tropical journal of pharmaceutical research **10** (2011), no. 1.
- [23]. A. El Ghaouth, J. Arul, A. Asselin and N. Benhamou, *Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: Induction of morphological and cytological alterations in rhizopus stolonifer*, Mycological research **96** (1992), no. 9, 769-779.

- [24]. A. Ali, M. T. M. Muhammad, K. Sijam and Y. Siddiqui, *Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (colletotrichum gloeosporioides penz.) of eksotika ii papaya*, International journal of food science & technology **45** (2010), no. 10, 2134-2140.
- [25]. M. Wisniewski, S. Droby, E. Chalutz and Y. Eilam, *Effects of ca^{2+} and mg^{2+} on botrytis cinerea and penicillium expansum in vitro and on the biocontrol activity of candida oleophila*, Plant Pathology **44** (1995), no. 6, 1016-1024.
- [26]. E. Carafoli, *Intracellular calcium homeostasis*, Annual review of biochemistry **56** (1987), no. 1, 395-433.
- [27]. D. Halachmi and Y. Eilam, *Cytosolic and vacuolar ca^{2+} concentrations in yeast cells measured with the ca^{2+} -sensitive fluorescence dye indo-1*, FEBS letters **256** (1989), no. 1-2, 55-61.
- [28]. A. Biggs, M. El-Kholi, S. El-Neshawy and R. Nickerson, *Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by monilinia fructicola*, Plant disease **81** (1997), no. 4, 399-403.
- [29]. J. Bonilla, E. Fortunati, L. Atarés, A. Chiralt and J. M. Kenny, *Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films*, Food Hydrocolloids **35** (2014), 463-470.

Ngày nhận bài: 03/02/2021

Ngày chấp nhận đăng: 30/03/2021