

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA PHỨC HỢP TINH DẦU VỎ *Citrus maxima* - β -CYCLODEXTRIN

TRẦN LỆ TRÚC HÀ¹, PHẠM NGUYỄN PHƯƠNG THẢO², HỨA TRƯỜNG CHINH³

TRẦN HOÀNG THẢO NHÌ³, HỒ THIÊN HOÀNG³

¹Ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Sinh học, Trường Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: hothienhoang@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v68i02.5072>

Tóm tắt. Tinh dầu có nhiều tiềm năng trong công nghệ bảo quản trái cây sau thu hoạch vì khả năng kháng các vi sinh vật. Tuy nhiên, sự bay hơi của tinh dầu đặt ra những thách thức cho hiệu quả khi để thời gian lâu. Để giải quyết vấn đề này, nghiên cứu này khám phá việc tổng hợp một phức hợp bao gồm beta-cyclodextrin (β -CDs) và dầu vỏ bưởi *Citrus maxima* (GEO) để tăng cường hoạt tính ổn định của nó. GEO đã được xác định bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp với phổ khối (GC-MS). Kết quả cho thấy có hiện diện của 12 hợp chất bay hơi, trong đó có bốn chất chính của GEO bao gồm: limonene (72.865%), *o*-cymene (13.891%), γ -terpinene (3.653%) và α -pinene (2.980%). Sự hình thành phức hợp β -CDs/GEO đã được xác nhận bằng phổ hồng ngoại FT-IR và phương pháp docking phân tử. Đặc tính kháng vi khuẩn của phức hợp đã được đánh giá trên *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bằng cách sử dụng phương pháp đo đường kính vùng ức chế và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), với giá trị MIC là 40mg/mL đối với *Echerichia coli* (ATCC 25922) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), và 20mg/mL đối với *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Hơn nữa, phức hợp cũng đã thể hiện hiệu quả kháng nấm bằng cách ức chế sự phát triển của *Aspergillus oryzae* và *Mucor* sp. trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 ngày. Những kết quả này làm nổi bật tiềm năng của β -CDs/GEO như chất kháng vi sinh vật tự nhiên và có thể được sử dụng như vật liệu bao gói thực phẩm có hoạt tính.

Từ khóa. Vi bao, tinh dầu bưởi, β -cyclodextrin, vi khuẩn, nấm mốc, bảo quản trái cây

1. GIỚI THIỆU

Tinh dầu là một hỗn hợp chứa các hợp chất bay hơi có các tác dụng sinh học khác nhau và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như: thực phẩm, đồ uống, mỹ phẩm, thuốc và làm chất tạo hương vị cũng như cho liệu pháp hương thơm. Tinh dầu cũng được sử dụng vì các đặc tính diệt khuẩn, chống oxy hóa và chống ung thư. Bên cạnh đó, việc ứng dụng tinh dầu thường thân thiện với môi trường và không độc hại. Tuy nhiên, do tính kém ổn định, dễ phân hủy và bay hơi của chúng [1], phạm vi ứng dụng của tinh dầu trong bảo quản thực phẩm còn hạn chế. Tinh dầu là hỗn hợp của hơn 300 hợp chất khác nhau, đa phần chúng ở trạng thái hơi do áp suất hơi của chúng cao ở áp suất khí quyển và nhiệt độ phòng [2]. Những hợp chất bay hơi này tương ứng với nhiều nhóm hóa học khác nhau, bao gồm: alcohol, ether, aldehyde, ketone, phenol, hợp vòng khác nhau và đặc biệt là terpenoids [3]

Sự thay đổi thành phần các chất hóa học và tỷ lệ phần trăm hoạt chất trong tinh dầu thiên nhiên phụ thuộc vào phân bố địa lý cũng như điều kiện môi trường [4]. Tinh dầu bưởi *Citrus maxima* là sản phẩm phụ chính của ngành công nghiệp chiết xuất nước trái cây và được sử dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Tinh dầu bưởi được chiết xuất từ vỏ bưởi và đã được sử dụng trong một thời gian dài với hương thơm đặc trưng [5]. Các thành phần có hoạt tính sinh học thường tồn tại trong tinh dầu của cây có mùi như: limonene, α -pinene, β -pinene và α -terpinolene có tác dụng kháng khuẩn và có phổ hoạt động rộng. Huseyin Karakaya, Oussalah, M. và cộng sự nghiên cứu nhiều tác dụng kháng khuẩn ở tinh dầu trên các loài thực vật khác [6-9].

Công nghệ vi bao (microencapsulation) hiện nay có thể được sử dụng để bảo vệ tinh dầu bay hơi ra môi trường bên ngoài và giữ tính ổn định cho tinh dầu. Công nghệ này được mô tả vắn tắt là quá trình bao phủ các chất có thể là khí, lỏng hoặc rắn vào trong lõi. Các hạt vỏ có kích thước từ vài trăm đến hàng ngàn

micrometre[10]. Cyclodextrins (CDs) là các oligosaccharide vòng xoắn được tạo ra do vi khuẩn như *Bacillus macerans* phân hủy tinh bột. Đặc tính nổi bật nhất của CDs là khả năng liên kết phân tử với hóa chất để tạo ra các phức hợp. Phức hợp được tạo thành khi các hợp chất gắn kết và đi vào bên trong lõi của CDs. Ngoài ra, không có liên kết cộng hóa trị nào bị phá vỡ hoặc được tạo ra, và các tương tác kỵ nước có thể là lực tương tác chính trong việc tạo ra các phức hợp này. Tinh dầu có tính chất kỵ nước, do đó CDs rất thích hợp trong việc tạo ra các tương tác và giữ lấy các hợp chất của tinh dầu. Bên cạnh đó, các hợp chất từ bên trong các hạt CDs sẽ được giải phóng chậm ra môi trường bên ngoài [11]. Với đặc tính không độc hại và hiệu quả kháng khuẩn và kháng nấm của tinh dầu để kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm. Do đó, việc kết hợp tinh dầu và CDs có thể mang lại nhiều tác dụng trong bảo quản thực phẩm. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy sự gia tăng đáng kể tính liên kết của tinh dầu khi chúng được tạo phức với CDs so với ứng dụng của chúng dưới dạng phân tử tự do. Việc sử dụng các phức hợp các chất với CDs thay vì chất tự do sẽ mang lại lợi ích là duy trì tác dụng trên thực phẩm lâu hơn và được sử dụng với liều lượng chính xác hơn tránh gây độc hại có thể xảy ra và làm giảm đáng kể các sửa đổi cảm quan không mong muốn có thể xảy ra để đảm bảo an toàn thực phẩm.

Nhằm phát triển các chất bảo quản xanh cho thực phẩm, nghiên cứu này nhằm mục đích làm cơ sở khoa học để tạo ra các túi khử trùng, hoặc các hộp giấy có khả năng kháng vi sinh vật ứng dụng kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm. Để đạt được mục tiêu này, tinh dầu bưởi đã được tách chiết, xác định thành phần hóa học và tạo vi bao với β -CDs. Cơ sở khoa học của việc tạo ra phức hợp vi bao đã được đánh giá. Bên cạnh đó, khả năng kháng khuẩn và kháng nấm đã được khảo sát nhằm tạo tiền đề cho việc phát triển và ứng dụng phức hợp β -CDs/tinh dầu bưởi.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hóa chất β -cyclodextrin (β -CDs) (Macklin Biochemical), Amikacin 10mcg, môi trường MHB, PDA (Himedia, Ấn Độ);

Vỏ bưởi được thu từ vườn tại tỉnh Tiền Giang, Việt Nam;

Các giống vi sinh vật bao gồm: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Aspergillus oryzae*, *Mucor* sp..

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chế tạo phức hợp β -cyclodextrin (β -CDs) và tinh dầu bưởi (GEO)

Tinh dầu được chiết xuất từ vỏ bưởi bằng phương pháp chưng cất hơi nước. Phức hợp tinh dầu bưởi (GEO) và β -cyclodextrin (β -CDs) được chuẩn bị bằng cách cho vào 1g β -CDs tinh khiết hòa tan trong 1 mL dung dịch ethanol-nước cất (1:3, v/v), trộn đều bằng cối chày sứ. Tiếp tục cho vào lần lượt GEO với các nồng độ 200 mg (GEO1), 400 mg (GEO2), 600 mg (GEO3). Trộn đều trong 5 phút. Phức hợp β -CDs/GEO được làm khô bằng máy đông khô. Nghiền thành bột mịn và lưu trữ. Đặc tính của mẫu được mang xác định bằng Fourier Transform infrared Spectroscopy (FT-IR) .

2.2.2. Phương pháp xác định thành phần hóa học của tinh dầu bưởi (GEO)

Phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS) thực hiện trên máy SCION 456-GC (USA), cột mao quản Fused silica (Rxi-5ms, RESTEK, Mỹ) (dài 30m; đường kính 0.25mm; phim dày 0.25mm) liên hợp với máy khối phổ MS SCION SQ, khí mang Heli (1.0 mL/phút) [12]. Chương trình nhiệt độ: 80° C (1 phút), tăng 5° C/phút đến 170° C, tăng 50° C/phút đến 280° C và giữ ổn định nhiệt độ ở 280° C.

2.2.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của sản phẩm

Tiến hành đánh giá khả năng kháng khuẩn của phức hợp β -CDs, (β -CDs, A1), (β -CDs, A2), và (β -CDs, A3). Cân 0.5 g vào 20 mL môi trường agar nước thịt đã được hấp khử trùng. Tiến hành đồ đĩa. Sau khi hỗn hợp hóa rắn, tiến hành trải các chủng vi sinh vật *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* với mật độ 5×10^5 CFU.mL⁻¹. Đánh giá sự xuất hiện của các khuẩn lạc.

Từ kết quả tốt nhất bên trên, tiến hành xác định khả năng kháng khuẩn thông qua vòng phân giải vi khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của β -CDs/GEO được biểu hiện dựa trên kích thước vòng kháng thông qua phương pháp khuếch tán giếng thạch. Hỗn hợp tinh dầu sẽ ức chế sự phát triển của *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* từ đó hình thành nên vòng kháng. Tiến hành tạo 2 giếng trên đĩa bằng đầu đục kim loại có đường kính 0.8

cm. Mỗi giếng cho vào 100 μL dung dịch $\beta\text{-CDs}$ (160mg mL^{-1}) và $\beta\text{-CDs/GEO}$ (160mg mL^{-1}), Giấy kháng sinh đối chứng Amikacin 10mcg (Himedia, Ấn Độ). Trãi các vi sinh vật *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* vào đĩa ở mật độ 0.5 McFarland ($1.5 \times 10^8 \text{CFU.mL}^{-1}$).

Hoạt tính ức chế các chủng vi khuẩn thử nghiệm được xác định phương pháp pha loãng hoạt chất. Pha loãng hỗn hợp $\beta\text{-CDs/GEO}$ trên đĩa 96 giếng và chất chỉ thị màu resazurin được sử dụng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Inhibitory Concentration). Để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, hỗn hợp này được pha loãng thành các nồng độ khảo sát từ 0 – 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dịch vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm và được pha loãng sao cho mật độ đạt $10^5\text{--}10^6 \text{CFU.mL}^{-1}$. Mỗi giếng gồm 50 μL dịch vi khuẩn trong môi trường MHB và 50 μL hỗn hợp ABC ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Các giếng đối chứng âm chứa dịch vi khuẩn và môi trường. Các giếng đối chứng dương chứa dịch vi khuẩn, môi trường và kháng sinh Amikacin ở các nồng độ pha loãng khác nhau từ 0 – 2.5 mg/mL. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các đĩa thử nghiệm và đối chứng sau đó được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, 20 μL thuốc thử resazurin 0.01 % được cho vào mỗi giếng. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Chất chỉ thị resazurin có màu xanh trong dung dịch. Các giếng có sự đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của hoạt chất có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin) [13].

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng nấm của sản phẩm

Tiến hành đánh giá khả năng kháng nấm của phức hợp $\beta\text{-CDs/GEO2}$. Chủng nấm mốc *Mucor sp.* và *Aspergillus oryzae* được nuôi trên các đĩa môi trường PDA (200g khoai tây, 20g dextrose, 20g agar và 1 lít nước) ủ 7 ngày đối với *A. oryzae* và 5 ngày đối với *Mucor sp.*. Sau đó cắt và chuyển những khoanh agar tròn có đường kính 5mm chứa tơ nấm sang các đĩa môi trường PDA có bổ sung $\beta\text{-CDs/GEO2}$ 0.2g/mL và 0.3g/mL. và để ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra tốc độ lan tơ của nấm mốc phát triển từ khoanh cấy ban đầu sau mỗi 2 ngày. Khả năng kháng nấm được xác định bằng cách đo đường kính sợi tơ nấm trong môi trường PDA có hoặc không có $\beta\text{-CDs/GEO2}$ [14, 15].

2.2.5. Phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR):

Để xác định tính chất của phức hợp $\beta\text{-CDs/GEO}$, phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) được sử dụng. Phương pháp FT-IR được sử dụng để xác định các tương tác và cấu trúc phân tử của các chất dựa trên việc phân tích phổ hấp thụ hoặc phản xạ của tia hồng ngoại tương tác với mẫu. Phổ FT-IR của CDs, GEO và phức hợp $\beta\text{-CDs/GEO}$ được xác định bằng thiết bị quang phổ hồng ngoại Fourier (Frontier FT-IR/NIR, Perkin Elmer, USA). Các phổ được ghi lại ở độ phân giải 4cm^{-1} và 40 lần quét/1phút trên bước sóng từ 450-4000 cm^{-1} .

2.2.6. Mô hình gắn kết phân tử của tinh dầu và $\beta\text{-CDs}$

Phương pháp mô hình hóa sự gắn kết phân tử được dùng để xác định sự tương tác của các phân tử. Phần mềm AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) đã được sử dụng trong nghiên cứu này để dự đoán các hợp chất có khả năng liên kết mạnh với $\beta\text{-CDs}$ [16]. Cấu trúc của $\beta\text{-CDs}$, là cấu tử liên kết trong cấu trúc của protein kinase (1ZON) được lấy từ Ngân hàng Dữ liệu Protein (PDB ID: 1ZON) [17]. Cấu trúc ba chiều (3D) của các cấu tử tinh dầu được lấy từ dữ liệu Pubchem [18]. Các cấu tử tinh dầu và $\beta\text{-CDs}$ được thêm các nguyên tử hydro và các điện tích Gasteiger bằng phần mềm AutoDockTools [19]. AutoGrid 4.2 đã được sử dụng để tính toán sơ đồ lưới trước khi ghép nối phân tử. Không gian của lưới là $40 \times 40 \times 40$, với khoảng cách lưới là 0,375 Å. Sau đó sử dụng phần mềm AutoDock 4.2 để đánh giá năng lượng liên kết (kcal.mol^{-1}) của tinh dầu và $\beta\text{-CDs}$.

2.2. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, Số liệu thu thập được tính giá trị trung bình các lần lặp lại, độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng công cụ Data analysis trong Microsoft excel 365 và thống kê bằng phần mềm Statgraphics XVIII (One-way ANOVA, n=3).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

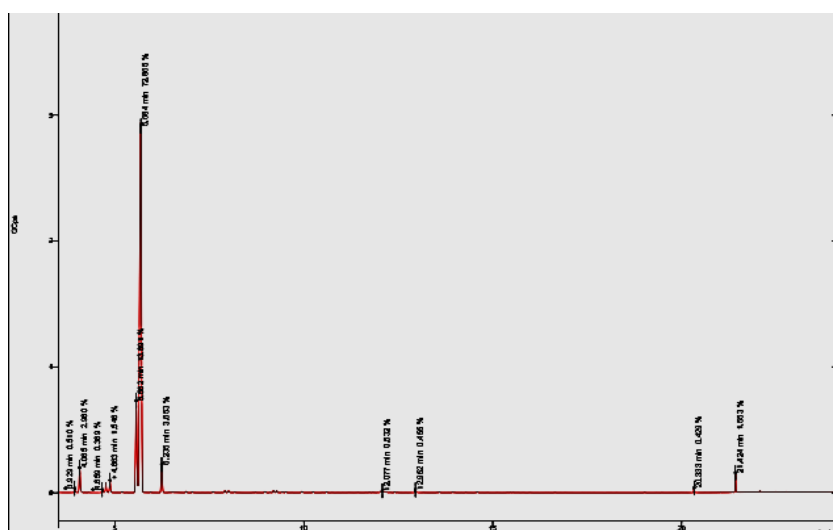
3.1. Thành phần hóa học của tinh dầu bưởi (GEO)

Thành phần hóa học của tinh dầu đã được phân tích bởi GC-MS. Sắc ký đồ được thể hiện trong Hình 1. Hàm lượng tương đối của mỗi thành phần được tính bằng phương pháp chuẩn hóa diện tích Peak. Các thành phần hóa học được xác định theo thời gian lưu và thư viện khối phổ NIST. Thành phần hóa học chính được trình bày trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1: Thành phần hóa học chính của tinh dầu vỏ bưởi

TT	Rt	Tên chất	Hàm lượng (%)	Mass	Độ tương hợp khối phổ
1	3.929	α -Phellandrene	0.510	136	924
2	4.065	α -Pinene	2.980	136	934
3	4.659	Sabinene	0.389	136	920
4	4.757	L- β -Pinene	1.196	136	952
5	4.863	β -Myrcene	1.546	136	942
6	5.562	o-Cymene	13.891	134	953
7	5.684	Limonene	72.865	136	930
8	6.235	γ -Terpinene	3.653	136	943
9	12.077	9-Oxononanoic acid methyl ester	0.532	186	900
10	12.952	Limonene-1,2-diol	0.455	170	890
11	20.333	Myristic acid, methyl ester	0.429	242	868
12	21.424	Tridecanoic acid, methyl ester	1.553	228	866

Hình 1: Sắc ký đồ GC của tinh dầu vỏ bưởi

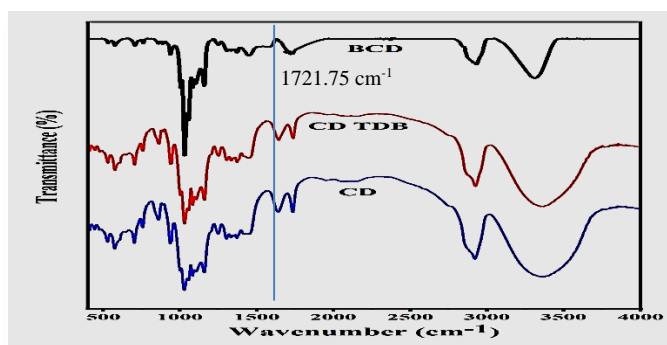


Thành phần hóa học chính của tinh dầu vỏ bưởi thu được là 12 hợp chất chiếm 99.1%. Trong đó chiếm cao nhất lần lượt là limonene (72.865 %), o-cymene (13.891 %), γ -terpinene (3.653 %), α -pinene (2.980 %), tridecanoic acid (1.553 %), β -myrcene (1.546 %), L- β -pinene (1,196 %). Kết quả cho thấy thành phần chính

không có sự khác biệt so với các nghiên cứu khác. Hàm lượng limonene (72.865%) tương tự như nghiên cứu của Virendra S. Rana [20] với hàm lượng limonene (70.9%). Tuy nhiên, hợp chất Limonene (72.865%), thấp hơn 7.9% so với nghiên cứu của H.X. Phong [21]. Trong khi đó, thành phần o-cymene (13.891%) cao hơn so với nghiên cứu của Natale Badalamenti [22] trên các vùng trồng bưởi *C. maxima* ở Sicily (Italy) với hàm lượng o-cymenen (0.6%).

3.2. Phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)

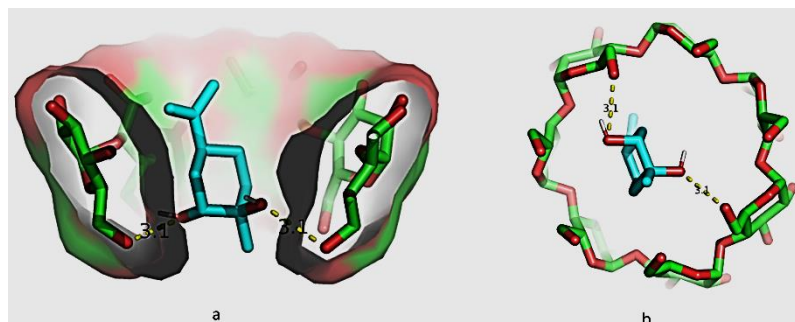
Tương tác tạo phức giữa tinh dầu bưởi và β -cyclodextrin (β -CDs) được đánh giá sơ bộ bằng phương pháp FT-IR (Hình 2) Kết quả phân tích phổ FT-IR của phức hợp β -cyclodextrin (β -CDs) trước và sau khi thêm vào tinh dầu bưởi (GEO) cho thấy cả hai mẫu đều hấp thụ ở một số peak giống nhau. Peak hấp thụ mạnh ở $938-1031\text{cm}^{-1}$ và 1156cm^{-1} , cho thấy có sự hiện diện của hợp chất glycosidic C – O và C – C. Phổ hồng ngoại của phức hợp β -cyclodextrin và tinh dầu bưởi (GEO) không có sự khác biệt so với β -CDs (a, b). Tuy nhiên, khi bổ sung GEO vào β -CDs đã làm giảm độ hấp thụ. Một số nghiên cứu kết hợp giữa β -CDs và tinh dầu của kinh giới cay (oregano essential oil) cũng cho thấy có sự trùng phổ hấp thụ [23]. Đỉnh hấp thụ của carbonyl (C=O) của các carboxyl acid ở 1721.75cm^{-1} đối với phức hợp tinh dầu β -CDs được pha trong dung dịch cồn. Điều này có thể thấy rằng. Lượng tinh dầu trong đó có các thành phần là myristic acid, tridecanoic acid, 9-oxononanoic acid giải phóng khỏi phức hợp.



Hình 2: Phổ Fourier Transform Infrared (FT-IR) a. β -cyclodextrin b. β -cyclodextrin-tinh dầu bưởi. c. β -cyclodextrin-tinh dầu bưởi trong cồn

3.3. Mô hình phân tử gắn kết tinh dầu và β -CDs

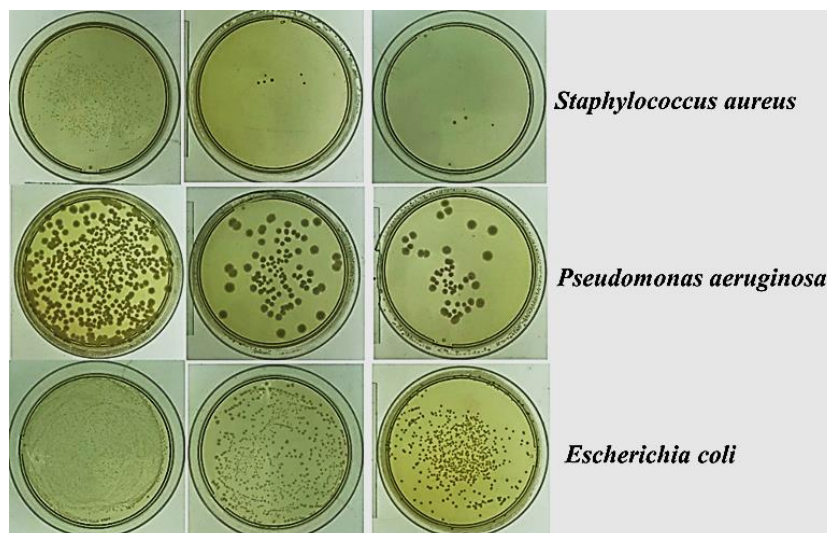
Để đánh giá các tương tác giữa các phân tử tinh dầu và với β -CDs. Phương pháp gắn kết phân tử sử dụng AutoDock 4.2 đã được thực hiện. Các phối tử được gắn vào vùng trung tâm của β -CDs, kết quả thể hiện trong Hình 2. Kết quả cho thấy Limonene-1,2-diol, α -Pinene và L- β -Pinene tương tác mạnh nhất với β -CDs với năng lượng liên kết lần lượt là $-4,6\text{ kJmol}^{-1}$, $-4,1\text{ kJmol}^{-1}$, và $-4,1\text{ kJmol}^{-1}$. Kết quả mô hình phân tử cho thấy rằng các phân tử vừa khít với vùng kỵ nước với cấu trúc xoắn cấu hình tuyến tính. Phân tích chi tiết cho thấy hai tương tác liên kết hydro yếu được hình giữa nhóm OH của Limonene-1,2-diol và β -CDs với khoảng cách $3,1\text{ \AA}$. Hai tương tác này đã hỗ trợ các phân tử Limonene-1,2-diol gắn vào vị trí liên kết của β -CDs.



Hình 3: Mô hình gắn kết phân tử giữa Limonene-1,2-diol và β -CDs bằng phần mềm AutodocVina 4.2. a) nhìn ngang, b) nhìn từ trên xuống

3.4. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của phức hợp β -CDs-GEO:

Phức hợp β -CDs/GEO với các tỉ lệ GEO khác nhau (1 gram β -CDs: 200mg GEO (β -CDs/GEO1); 1 gram β -CDs: 400mg GEO (β -CDs/GEO2); 1 gram β -CDs: 600mg GEO (β -CDs/GEO3)) được chuẩn bị theo phương pháp 2.2.1. Kết quả đếm khuẩn lạc trên mỗi đĩa là cơ sở để lựa chọn phức hợp β -CDs/GEO tốt nhất cho những thí nghiệm tiếp theo. Kết quả được trình bày ở hình 3.



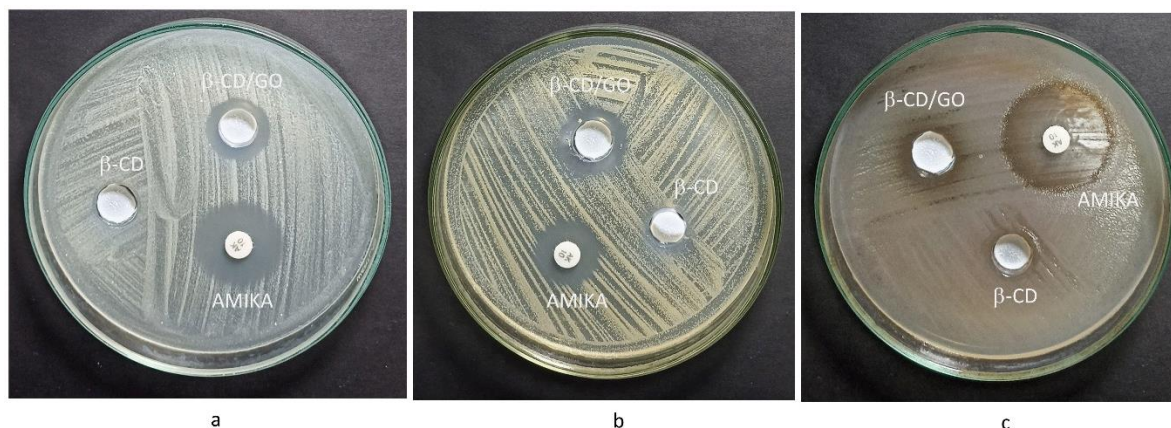
Hình 4: Các chủng vi sinh vật (mật độ 10^5 CFU/mL) được ủ trên đĩa petri với các nghiệm thức a). β -CDs/GEO1; b). β -CDs/GEO2; c). β -CDs/GEO3

Kết quả hình 4 cho thấy β -CDs/GEO2 và β -CDs/GEO3 có khả năng kháng mạnh nhất lần lượt là *S. aureus* > *P. aeruginosa* > *E. coli*. Trong đó cả 2 phức hợp β -CDs/GEO2 và β -CD/GEO3 đều cho thấy khả năng diệt 99% *Staphylococcus aureus*. Do đó, chúng tôi chọn phức hợp β -CDs/GEO2 cho những nghiên cứu tiếp theo.

Chúng tôi tiến hành đánh giá ước lượng khả năng kháng khuẩn của phức hợp β -CDs/GEO2 dựa vào đường kính vùng kháng khuẩn đối với các vi sinh vật gram dương *S. aureus* và vi khuẩn gram âm *P. aeruginosa* và *E. coli*. Theo các nghiên cứu được công bố trước đây, đường kính của vùng ức chế (DIZ) được đánh giá như sau: Không nhạy cảm (đường kính ≤ 8.0 mm), nhạy cảm vừa phải ($8.0 < \text{đường kính} < 14.0$ mm), nhạy cảm ($14.0 < \text{đường kính} < 20.0$ mm), và cực kỳ nhạy cảm (đường kính ≥ 20.0 mm). Kết quả cho thấy β -CDs/GEO2 có hoạt tính kháng khuẩn nhất định đối với tất cả các mầm bệnh đã được thử nghiệm, DIZ đạt giá trị tối đa giá trị đối với *S. aureus* (16.2 ± 2.1 mm), tiếp theo là *P. aeruginosa* (13.3 ± 1.3 mm), *E. coli* (10.1 ± 0.4 mm), như trong Bảng 2. Kết quả cho thấy phức hợp β -CDs/GEO2 có mức độ nhạy cảm vừa phải đối với các chủng vi sinh vật gram âm. Trong khi đó, kết quả cho thấy phức hợp này có hiệu quả và nhạy cảm đối với vi sinh vật gram dương.

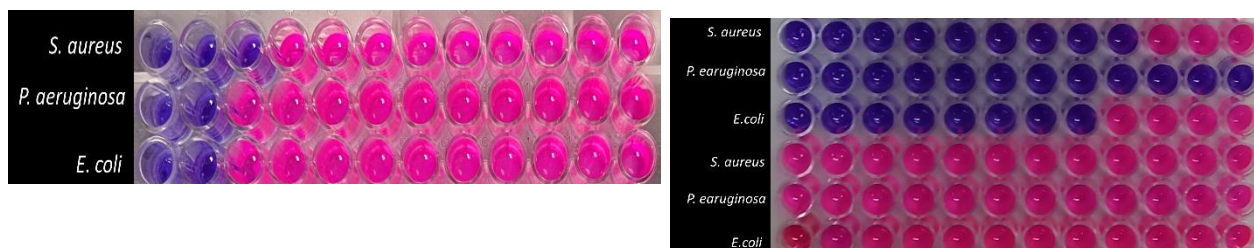
Bảng 2: Khả năng kháng khuẩn của phức hợp tinh dầu bưởi: β -CDs-GEO2

Vi khuẩn	Đường kính kháng khuẩn của: β -CDs-GEO2	Đường kính kháng khuẩn của Amikacin
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.5 ± 0.5 mm	23.0 ± 0.2 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.1 ± 0.3 mm	16.0 ± 0.5 mm
<i>Escherichia coli</i>	10.1 ± 0.2 mm	14.2 ± 0.1 mm



Hình 5: Hoạt tính ức chế a. *Staphylococcus aureus*, b. *Pseudomonas aeruginosa* c. *Escherichia coli* của β -CDs-GEO2 dựa trên vòng kháng khuẩn.

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của các phức hợp vi bao có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin). Kết quả được trình bày ở Hình 6.



Hình 6. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* và các chứng dương, chứng âm trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm
A. *S. aureus*, b. *P. aeruginosa* c. *E. coli* B. Chứng dương và chứng âm

Ở *S. aureus*, β -CDs/GEO2 có nồng độ MIC đạt giá trị thấp nhất là 20.0 mg/mL cho thấy β -CDs/GEO2 có khả năng kháng tốt đối với *S. aureus* ngay cả khi ở nồng độ thấp. *S. aureus* là một trong những vi khuẩn phổ biến sống ở da, lỗ chân lông và đường tiêu hóa của con người. Những công nhân không có triệu chứng có thể làm nhiễm thực phẩm qua tiếp xúc bằng tay hoặc lây truyền thông qua dịch tiết đường hô hấp. Do đó, *S. aureus* trở thành nguồn gây ngộ độc thực phẩm. Nhiễm độc đường tiêu hóa này xảy ra sau khi ăn phải thực phẩm bị nhiễm độc do *S. aureus* sinh ra. Vì vậy, nhiễm thực phẩm do *S. aureus* gây ra là một vấn đề nghiêm trọng đối với cả ngành công nghiệp thực phẩm và hệ thống chăm sóc sức khỏe [24]. Huseyin Karakaya báo cáo hoạt tính ức chế vi sinh vật ở tinh dầu bưởi *Citrus maxima* với nồng độ nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) 2.0 μ g/mL [25]. Nghiên cứu của Oussalah, M. cho thấy *S. aureus* rất nhạy và bị ức chế bởi 26 loại tinh dầu khác nhau với nồng độ ức chế tối thiểu \leq 4.0 μ L/mL [26]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu các phức hợp vi bao và tinh dầu có khả năng chống lại *S. aureus* còn nhiều hạn chế và chưa phổ biến. Cho nên khả năng kháng *S. aureus* trong nghiên cứu này cho thấy nhiều tiềm năng ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.

P. aeruginosa là vi khuẩn cơ hội gây bệnh ở người. Đặc biệt, trong thực phẩm thịt đông lạnh *P. aeruginosa* có thể sống ở nhiều nhiệt độ khác nhau. Do đó, *P. aeruginosa* cũng là mối nguy trong quản lý và bảo quản thực phẩm [27]. Trong nghiên cứu này cho thấy phức hợp β -CDs/GEO2 có khả năng ức chế *P. aeruginosa* với giá trị MIC=40.0 mg/mL. Lachimanan Yoga Latha và ctv (2010) đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất *Vernonia cinerea* (L.) với *P. aeruginosa* cho giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 3.1 mg/mL [28].

E. coli là trực khuẩn gram âm, dễ dàng phát triển trên môi trường nuôi cấy thông thường; hiếu kỵ khí tùy tiện; lên men nhiều loại đường và sinh hơi. Trong đường tiêu hóa, *E. coli* chiếm khoảng 80% các vi khuẩn hiếu khí. Nhưng *E. coli* cũng là vi khuẩn gây bệnh quan trọng, đứng đầu trong các vi khuẩn gây tiêu chảy, viêm đường tiết niệu, viêm đường mật; đứng đầu trong các căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết. *E. coli* có

thể gây nhiều bệnh khác như viêm phổi, viêm màng não, nhiễm khuẩn vết thương [29]. Trong nghiên cứu này cho thấy phức hợp β -CDs/GEO2 có khả năng ức chế *E. coli* với giá trị MIC=40.0 mg/mL. Jin Wang (2019) đã sử dụng tinh dầu của nhục đậu khấu *Myristica fragrans* Hott. Kết hợp β -CDs để chống lại các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm như: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Bacillus subtilis*. Trong đó giá trị MIC với *Escherichia coli* là 1.9 mg/mL [30].

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của β -CDs-GEO2 với các chủng vi khuẩn được thử nghiệm

Chủng vi sinh vật	Nồng độ ức chế tối thiểu của: β -CDs-GEO2 (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	20.0
<i>P. aeruginosa</i>	40.0
<i>E. coli</i>	40.0

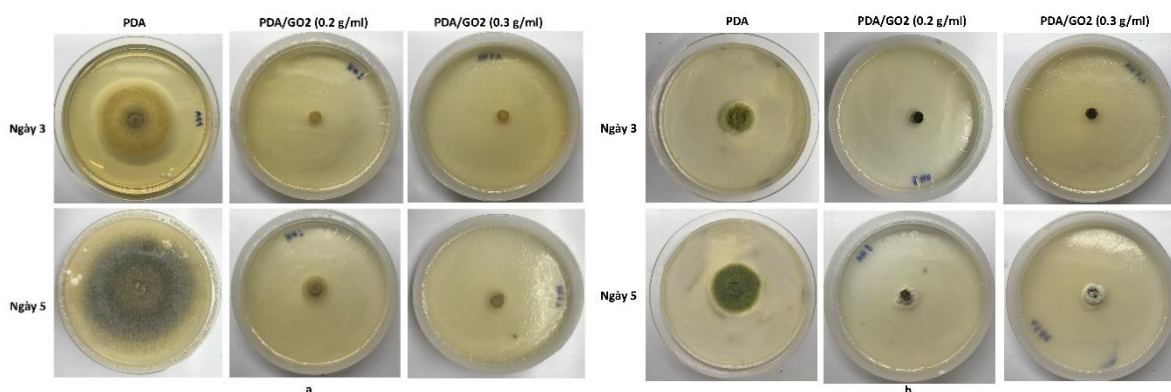
Hiệu quả của phức hợp bao gồm β -CDs/GEO2 đối với vi khuẩn Gram dương *S. aureus* tốt hơn so với chống lại vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*), kết quả phù hợp với các kết quả trước đó của Smith-Palmer (2002) và Sun (2014) [31, 32]. Có thể giải thích rằng các đặc tính kháng khuẩn của β -CDs/GEO2 có liên quan đến đặc tính ưa béo, dẫn đến tích tụ trong màng. Các hợp chất này sẽ thay thế lipid có trên màng và ảnh hưởng đến cấu trúc của màng tế bào [33]. Tuy nhiên, vi khuẩn Gram âm có một màng bên ngoài, cung cấp một bề mặt ưa nước, ức chế sự liên kết của hợp chất ưa béo như tinh dầu bay hơi với màng tế bào [34].

3.5. Đánh giá khả năng kháng nấm của β -CDs/GEO2:

β -CDs/GEO2 được hòa tan và phân tán trong môi trường thạch. Hiệu quả kháng nấm của β -CDs/GEO2 được xác định bằng cách đo đường kính sợi tơ nấm trong môi trường PDA. Kết quả được trình bày trong bảng 4, hình 7. Kết quả cho thấy rằng khi β -CDs/GEO2 được khuếch tán trong PDA, sự phát triển sợi nấm của 2 loại nấm thử nghiệm bị ức chế ở một mức độ nào đó. Sự khác biệt đáng kể ở mẫu có và không có GEO2 có thể được quan sát thấy một cách rõ ràng qua đường kính sợi tơ nấm. Sự phát triển của sợi tơ nấm của các loại nấm thử nghiệm khác nhau, mạnh nhất là *Mucor sp.*, tiếp theo là *Aspergillus oryzae*. Khi có sự bổ sung β -CDs/GEO2, hầu hết sợi tơ nấm bị ức chế. Những kết quả này chỉ ra rằng β -CDs/GEO2 có thể kiểm soát sự phát triển của nấm và chứng tỏ hoạt tính kháng nấm tốt trong khoảng thời gian từ 1-3 ngày. Sau thời gian 5 ngày, hoạt tính kháng nấm vẫn còn, tuy nhiên bắt đầu có sự lan tơ nấm ở cả *Mucor sp.* và *Aspergillus oryzae*

Bảng 4: Đường kính tơ của *Mucor sp.* và *Aspergillus oryzae*

Nấm mốc	Đường kính tơ nấm (cm) trên môi trường PDA (mm)		Đường kính tơ nấm (cm) trên môi trường PDA có bổ sung β -CDs/GEO2 (0.2g/ml)		Đường kính tơ nấm (cm) trên môi trường PDA có bổ sung β -CDs/GEO2 (0.3g/ml)	
	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 3	Ngày 5
<i>Mucor sp.</i>	4.5 ± 0.06	9.0 ± 0.00	0.7 ± 0.06	1.4 ± 0.10	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.06
<i>Aspergillus oryzae</i>	2.0 ± 0.10	3.4 ± 0.06	0.6 ± 0.06	1.4 ± 0.06	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.06



Hình 7: Hoạt tính kháng nấm của β -CDs/GEO2 với a) *Mucor sp.* b) *Aspergillus oryzae*

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp được phức hợp β -cyclodextrin và tinh dầu bưởi. Tỷ lệ β -cyclodextrin với tinh dầu bưởi cho hoạt tính kháng khuẩn là 1g β -cyclodextrin: 400 mg tinh dầu bưởi. Kết quả phân tích FT-IR và gắn kết phân tử (molecular docking) cho thấy Limonene-1,2-diol, α -Pinene và L- β -Pinene có khả năng gắn kết vào β -cyclodextrin. Các vi bao của tinh dầu bưởi có hoạt tính kháng khuẩn với *S. aureus* MIC=20.0 mg/mL, *P. aeruginosa* và *E. coli* MIC=40.0 mg/mL. Phức hợp β -cyclodextrin và tinh dầu bưởi có khả năng kháng nấm *Mucor* sp và *Aspergillus oryzae* tốt từ ngày một đến ngày ba. Qua nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất rằng việc sử dụng phương pháp vi bao tinh dầu bưởi với β -cyclodextrin có thể được áp dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm để kéo dài thời gian bảo quản của sản phẩm trái cây.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ về kinh phí theo chương trình nghiên cứu khoa học cấp cơ sở của Trường Đại học Nguyễn Tất Thành theo số hợp đồng: 2022.01.80/HĐ-KHCN

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Kavetsou, E., et al. *Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin–Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil*. in *Micro*. 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021.
- [2]. Pophof, B., G. Stange, and L. Abrell, *Volatile organic compounds as signals in a plant–herbivore system: electrophysiological responses in olfactory sensilla of the moth *Cactoblastis cactorum**. *Chemical Senses*, **30**(1): p. 51-68, 2005.
- [3]. Dhifi, W., et al., *Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review*. *Medicines*, **3**(4): p. 25, 2016.
- [4]. Mehalaine, S., et al., *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three medicinal plants from Algerian semi-arid climatic zone*. *Phytothérapie*, **16**(S1): p. S155-S163, 2018.
- [5]. Zhang, X., et al., *The Preparation of the Essential Oil from Pomelo (*Citrus maxima* 'Shatian Yu') Peel Using Microwave-Assisted Distillation by Pectinase Soaking and Its Anti-Fungal Activity*. *Separations*, **9**(7): p. 161, 2022.
- [6]. Jirovetz, L., et al., *Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds from Bulgaria that had been stored for up to 36 years*. **40**(3): p. 305-310, 2005.
- [7]. Magwa, M.L., et al., *Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum**. **103**(1): p. 85-89, 2006.
- [8]. Skočibušić, M., N. Bezić, and V.J.F.c. Dunkić, *Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia*. **96**(1): p. 20-28, 2006.
- [9]. Matasyoh, L.G., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya*. **6**(6), 2007.
- [10]. Stan, M.S., et al., *Essential oil microcapsules immobilized on textiles and certain induced effects*. *Materials*, **12**(12): p. 2029, 2019.
- [11]. Musilová, L., et al., *Interactions between Sodium Hyaluronate and β -Cyclodextrin as Seen by Transport Properties*. *International journal of molecular sciences*, **24**(3): p. 2889, 2023.
- [12]. Wang, B., et al., *Essential oils and ethanol extract from *Camellia nitidissima* and evaluation of their biological activity*. *Journal of food science and technology*, **55**: p. 5075-5081, 2018.
- [13]. Chakansin, C., et al., *Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions*. *Analytical Biochemistry*, **637**: p. 114449, 2022.
- [14]. Zhu, C., et al., *Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **107**: p. 46-50, 2019.
- [15]. Wang, Y., et al., *β -Cyclodextrin inclusion complex containing *Litsea cubeba* essential oil: preparation, optimization, physicochemical, and antifungal characterization*. *Coatings*, **10**(9): p. 850, 2020.
- [16]. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *Journal of computational chemistry*, **31**(2): p. 455-461, 2010.
- [17]. Polekhina, G., et al., *Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase*. *Structure*, **13**(10): p. 1453-1462, 2005.
- [18]. Bolton, E.E., et al., *PubChem3D: a new resource for scientists*. *Journal of cheminformatics*, **3**: p. 1-15, 2011.

- [19]. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. Journal of computational chemistry, **30**(16): p. 2785-2791, 2009.
- [20]. Rana, V.S. and M.A. Blazquez, *Compositions of the volatile oils of Citrus macroptera and C. maxima*. Natural Product Communications, **7**(10): p. 1934578X1200701032, 2012.
- [21]. Huynh, X.P., et al., *THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH CỦA TINH DẦU TỪ VỎ BUỒI DA XANH (Citrus maxima (Burm.) Merr.)*. Hue University Journal of Science: Natural Science, **130**(1C): p. 75-83, 2021.
- [22]. Badalamenti, N., et al., *Reuse of Food Waste: The Chemical Composition and Health Properties of Pomelo (Citrus maxima) Cultivar Essential Oils*. Molecules, **27**(10): p. 3273, 2022.
- [23]. Huang, H., et al., *Preparation and characterization of β -cyclodextrin-oregano essential oil microcapsule and its effect on storage behavior of purple yam*. Journal of the Science of Food and Agriculture, **100**(13): p. 4849-4857, 2020.
- [24]. Bencardino, D., G. Amagliani, and G. Brandi, *Carriage of Staphylococcus aureus among food handlers: An ongoing challenge in public health*. Food Control, **130**: p. 108362, 2021.
- [25]. Karakaya, H., et al., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Pummelo (Citrus maxima) Essential Oil Derived from Fruit Peel*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, **25**(3): p. 524-535, 2022.
- [26]. Oussalah, M., et al., *Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes*. Food control, **18**(5): p. 414-420, 2007.
- [27]. Gu, X., et al., *Predicting the growth situation of Pseudomonas aeruginosa on agar plates and meat stuffs using gas sensors*. Scientific reports, **6**(1): p. 1-12, 2016.
- [28]. Latha, L.Y., et al., *Antibacterial activity and morphological changes of Pseudomonas aeruginosa cells after exposure to Vernonia cinerea extract*. Ultrastruct Pathol, **34**(4): p. 219-25. DOI: 10.3109/01913121003651513, 2010.
- [29]. Vogt, R.L. and L. Dippold, *Escherichia coli O157: H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002*. Public health reports, **120**(2): p. 174-178, 2005.
- [30]. Okwu MU, O.M., Akpoka AO, Izevbuwa OE, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review*. AIMS Microbiol, **Apr 15**: p. 5(2):117-137. DOI: 10.3934/microbiol.2019.2.117, 2019.
- [31]. Smith-Palmer, A., J. Stewart, and L. Fyfe, *Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens*. Letters in applied microbiology, **26**(2): p. 118-122, 1998.
- [32]. Sun, X., et al., *Antimicrobial and mechanical properties of β -cyclodextrin inclusion with essential oils in chitosan films*. Journal of agricultural and food chemistry, **62**(35): p. 8914-8918, 2014.
- [33]. Di Pasqua, R., et al., *Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils*. Journal of agricultural and food chemistry, **55**(12): p. 4863-4870, 2007.
- [34]. Andrade, T.A., et al., *Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in β -cyclodextrin*. Biomedicine & Pharmacotherapy, **89**: p. 201-207, 2017.

STUDY ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF β CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES WITH *Citrus maxima* PEEL ESSENTIAL OIL

TRẦN LỆ TRÚC HÀ¹, PHẠM NGUYỄN PHƯƠNG THẢO², HỨA TRƯỜNG CHINH³ TRẦN HOÀNG THẢO NHI³, HỒ THIÊN HOÀNG^{3*}

¹Department of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

²Department of Biology and Biotechnology, University of Science.

^{3*}Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

*Corresponding author: hothienhoang@iuh.edu.vn

Abstract. The potential of essential oil in post-harvest fruit preservation is well-recognized due to its inherent ability to inhibit microorganisms. However, its volatility poses challenges for prolonged effectiveness. To address this issue, the present study explores the synthesis of an encapsulation complex involving beta-cyclodextrin (β -CDs) and *Citrus maxima* peel essential oil (GEO) to enhance its sustained

activity. GEO's were determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). GEO's GC-MS investigation revealed the presence of 12 volatile compounds, with the following four being the essential oil's primary constituents: limonene (72.865 %), o-cymene (13.891 %), γ -terpinene (3.653 %) and α -pinene (2.980 %). The formation and characterization of the β -CDs/GEO complex were confirmed using FT-IR spectroscopy and molecular docking methods. The antimicrobial properties of the complex were evaluated against *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) using the inhibitory zone diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) methods, with MIC values of 40.0 mg/mL against *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and 20.0 mg/mL against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Furthermore, the complex demonstrated antifungal efficacy by inhibiting the growth of *Aspergillus oryzae* and *Mucor sp.* over a 1 to 3-day period. These findings highlight the potential of β -CDs/GEO as natural antimicrobials and could be used as active food-packaging material.

Keywords. Microencapsulation, beta-cyclodextrin, *Citrus maxima* pell essential oil, antibacterial, antifungal

Ngày nhận bài: 06/03/2023

Ngày chấp nhận đăng: 08/09/2023