

- Huang L., Li Q., Chen Y., Wang X. and Zhou X.**, 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps spp.*, *African Journal of Microbiology Research* 3(12):957-961.
- Li J., Guan M., Li Y.**, 2015. Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*. *Procedia Engineering*, 102:485-491.
- Ma L., Zhang S. and Du M.**, 2015. Cordycepin from *Cordyceps militaris* prevents hyperglycemia in alloxan. *Induced diabetic mice Nutrition research*, 35:431-39.
- Mo M., Hu S., Xu X., Ma Z., Ni Y., Wei Y, Nie J.**, 2013. Optimization of extraction technology of polysaccharide of *Tricholom giganteum*. *Pharmacology & Pharmacy*, 4:1-5.
- Peter C.K. Cheung**, 2008. Mushrooms as functional foods. *A John Wiley & Sons Inc, USA*.
- Shashidhar M.G., Giridhar P., Udaya Sankar K., Mahohar B.**, 2013. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review, *Journal of Functional foods*, 5(3):1013-1030.
- Wu P., Tao Z., Liu H, Jiang G., Ma C., Wang C., Geng D.**, 2014. Effects of heat on the biological activity of wild *Cordyceps sinensis*, *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2:32-38.
- Yu S. H., Dubey N. K., Li W. S., Liu M. C., Chiang H. S., Leu S. J. and Deng W. P.**, 2016. *Cordyceps militaris* treatment preserves renal function in type 2 diabetic nephropathy mice, *PLoS One*, 11(11), [e0166342]. DOI: 10.1371/journal.pone.0166342.

Effect of drying and extraction temperature on variation of bioactive compound and sensory properties of spent *Cordyceps militaris* substrate

Nguyen Thi Thanh Thuy, Phi Quyet Tien

Abstract

Cordyceps militaris has an effect for enhancing health, anti-cancer, anti-inflammatory due to some bioactive compounds including adenosine and cordycepin. These compounds vary depending on many factors such as culture media, heat treatment method etc. Apart from the fruiting body being the main parts to be harvested, the spent of *Cordyceps militaris* substrate is now only dried, used in raw form. This research aims to find the effect of drying and extraction temperatures on the change of bioactive substances and sensory properties. The two types of spent *Cordyceps militaris* were grown on semi-synthetic media (MT1) with the adenosine of 0.34 mg/g; cordycepin of 2.34 mg/g and on the natural media (MT2), with these two active compounds at 0.36 mg/g; 2.71 mg/g, respectively. The results showed that the obtained bioactive compound was highest with a good sensory point at the drying temperature of 70°C. The extraction conditions indicated the best bioactive substances content and the best sensory points were at 90°C in 15 min and 90°C in 20 min for MT1; 95°C in 10 min for MT2.

Key words: Spent *Cordyceps militaris* substrate, adenosine, cordycepin

Ngày nhận bài: 9/7/2017

Ngày phản biện: 13/7/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Xuân Cảnh

Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA MỘT SỐ LOẠI TINH DẦU

Nguyễn Thị Mai Hương¹, Hồ Tuấn Anh¹

TÓM TẮT

Bài báo trình bày nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu: Tinh dầu hương nhu (*Ocimum gratissimum*), tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*), tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*), tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*), tinh dầu nghệ vàng (*Curcuma longa*) đối với các loài vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. putida*, *L. damsella* so sánh đối chứng dương với 2 loại kháng sinh là gentamycin và streptomycin. Nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch cho thấy các loại tinh dầu đều có khả năng kháng khuẩn, trong đó tinh dầu quế thể hiện khả năng cao nhất. Đã xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và thời gian diệt khuẩn của tinh dầu quế đối với *B. cereus* tương ứng là 0,25% và 10 phút, đối với *E. Coli* là 0,5% và 20 phút. Theo tỉ lệ nồng độ diệt khuẩn tối thiểu/nồng độ ức chế tối thiểu (MBC/MIC) đã xác định được tinh dầu quế là chất diệt khuẩn, tinh dầu bạc hà là chất kìm khuẩn đối với *B. cereus* và *E. coli*. Nghiên cứu đã chỉ ra hiệu quả của một số loại tinh dầu có tác dụng tương đương các chất kháng sinh.

Từ khóa: Tinh dầu, kháng vi sinh vật, vòng kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu, nồng độ diệt khuẩn tối thiểu

¹Trường Đại học Kinh tế Kỹ thuật Công nghiệp

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam với điều kiện khí hậu nhiệt đới rất thuận lợi cho sự sinh trưởng của đa dạng các loài thực vật có chứa tinh dầu. Tinh dầu được biết đến từ lâu là hương liệu sử dụng trong các lĩnh vực thực phẩm, mỹ phẩm.

Ngày nay, hiện tượng kháng kháng sinh ngày càng trở nên phổ biến, kháng sinh không còn là liều thuốc vạn năng như khi mới tìm thấy. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã báo động về nguy cơ kháng kháng sinh đối với nhiều loại vi sinh vật gây bệnh (Nguyễn Văn Kính và *ctv.*, 2010). Nhiều hướng nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để giảm thiểu sử dụng kháng sinh, trong đó sử dụng tinh dầu là một phương pháp tuy không mới nhưng đã đem lại nhiều kết quả khả quan.

Khả năng kháng khuẩn của một số tinh dầu phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thành phần, nồng độ, thời gian tiếp xúc với tinh dầu và chủng vi sinh vật. Sự tăng trưởng của vi sinh vật kháng hoặc đa kháng kháng sinh có thể bị ức chế bởi một số loại tinh dầu. Tinh dầu họ cam quýt, cây oải hương, cây bạc hà, cây bách xù, cây chè, cây húng tây và cây khuynh diệp có hiệu quả đặc biệt chống lại vi khuẩn *S. aureus* kháng methiciline (MRSA) (Tohidpour *et al.*, 2010) và các khuẩn cầu ruột kháng vancomycine (ERV) (Fisher, 2009).

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của một số loại tinh dầu như hương nhu, quế, bạc hà, nghệ vàng, húng quế có mục tiêu làm phong phú thêm tính ứng dụng của tinh dầu trong bảo quản thực phẩm hoặc trong y tế.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 5 loại tinh dầu: Tinh dầu hương nhu (*Ocimum gratissimum*), tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*), tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*), tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*), tinh dầu nghệ vàng (*Curcuma longa*) được chưng cất bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước (Đỗ Tất Lợi, 2006).

- Sử dụng các vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*, *Listonella damsella* từ bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Kháng sinh gentamycin 50 µg/ml và streptomycin 50 µg/ml vô trùng làm đối chứng dương.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khuếch tán trên thạch sử dụng đĩa giấy

Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường lỏng MPA và nuôi ở 30°C trong thời gian 24 h. Sau đó vi khuẩn được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,9%. Mật độ vi sinh vật khoảng 10⁸ CFU/ml bằng phương pháp so sánh độ đục với ống chuẩn 0,5 McFarland (10⁸ CFU/ml) hoặc tiến hành đo quang ở λ=500 nm, DO= 0,125. Lấy 100 µl mỗi chủng cấy trải lên đĩa petri và lấy 20 µl từ 5 loại tinh dầu đưa lên tấm giấy lọc vô trùng có đường kính 0,5 cm.

2.2.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum bactericidal concentration - MBC)

MIC là nồng độ nhỏ nhất của tinh dầu mà tại đó nó ức chế sự phát triển của vi khuẩn. MBC là nồng độ thấp nhất của tinh dầu mà tại đó 99,9% lượng vi khuẩn bị tiêu diệt.

- Tinh dầu được pha loãng trong nước có bổ sung thêm 0,1% v/v Tween 20.

- Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường lỏng MPA và nuôi ở 30°C trong 24 h.

- Cấy vi sinh vật vào ống có bổ sung tinh dầu ở nồng độ khác nhau. Ống đối chứng không bổ sung tinh dầu. Lấy 100 µl mỗi chủng cấy trải lên đĩa petri môi trường MPA (không có tinh dầu). Sau 24 h nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, đánh giá sự phát triển của vi sinh vật bằng cách xác định số lượng khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc.

Khả năng ức chế được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = (1 - T/C) \times 100$$

Trong đó: T là CFU/ml mẫu thử nghiệm; C là CFU/ml đối chứng.

2.2.3. Xác định thời gian ức chế sinh trưởng của tinh dầu quế và bạc hà đối với *B. cereus* và *E. coli*

- Lấy 500 µl giống vi khuẩn đã được hoạt hóa trong môi trường lỏng cho vào 2 ống eppendorf trộn đều với 100 µl tinh dầu có nồng độ ức chế tối thiểu. Sau các khoảng thời gian tương ứng: 0', 5', 10', 20', 30', 40', 50', 60', 90' dùng pipette hút 20 µl dịch cấy trên đĩa thạch môi trường đặc. Sau 24 h nuôi cấy ở 30°C xác định thời gian diệt khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm được xác định bằng phân tích phương sai ANOVA với

sự hỗ trợ của phần mềm R. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại mỗi công thức thí nghiệm.

2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành từ 10/2016 - 3/2017 tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế Kỹ thuật Công nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

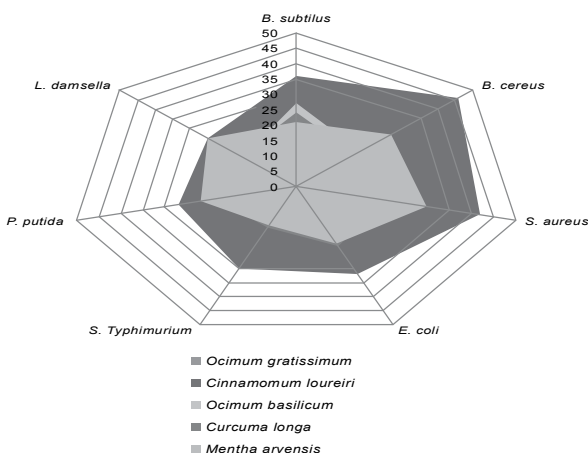
3.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của một số tinh dầu

Kích thước vòng kháng khuẩn thu được khi thực hiện các thí nghiệm theo mô tả trong 2.2.1 nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu và 2 loại kháng sinh đối với 7 chủng vi khuẩn được thể hiện trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Kích thước vòng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với 7 chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Kích thước vòng kháng khuẩn, D (mm)						
	<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Cinnamomum loureiri</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Curcuma longa</i>	<i>Mentha arvensis</i>	Gentamycin 50µg/ml	Streptomycin 50µg/ml
<i>B. subtilis</i>	25 ± 0,01	36 ± 0,05	27 ± 0,05	24 ± 0,11	21 ± 0,15	27 ± 0,14	30 ± 0,01
<i>B. cereus</i>	22 ± 0,03	46 ± 0,02	18 ± 0,19	22 ± 0,17	27 ± 0,02	25 ± 0,02	16 ± 0,23
<i>S. aureus</i>	20 ± 0,11	42 ± 0,08	15 ± 0,01	20 ± 0,13	30 ± 0,03	26 ± 0,01	29 ± 0,08
<i>E. coli</i>	20 ± 0,03	32 ± 0,14	10 ± 0,03	17 ± 0,02	21 ± 0,18	24 ± 0,01	30 ± 0,01
<i>S. typhimurium</i>	17 ± 0,01	30 ± 0,09	3 ± 0,01	15 ± 0,02	14 ± 0,21	23 ± 0,17	20 ± 0,03
<i>P. putida</i>	18 ± 0,05	27 ± 0,21	12 ± 0,11	19 ± 0,16	22 ± 0,19	18 ± 0,03	20 ± 0,13
<i>L. damsella</i>	21 ± 0,01	25 ± 0,05	15 ± 0,14	16 ± 0,01	25 ± 0,12	16 ± 0,01	19 ± 0,07

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn và giá trị phương sai $p < 0,05$



Hình 1. Kích thước vòng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với 7 chủng vi khuẩn

Hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu được đánh giá trong mối liên quan với đường kính vòng kháng khuẩn. Có thể phân loại độ mẫn cảm của tinh dầu đối với vi sinh vật dựa vào kích thước vòng kháng khuẩn như sau (Zanil, 2000): Không mẫn cảm (-) : D < 8 mm; Mẫn cảm (+) : D = 9 - 12 mm; Rất mẫn cảm (++) : D = 13 - 18 mm; Cực kỳ mẫn cảm (+++) : D > 18 mm.

Kết quả đạt được cho thấy, tất cả 5 loại tinh dầu đều có hoạt tính kháng khuẩn với 7 chủng vi khuẩn nghiên cứu. Tinh dầu hương nhu *Ocimum gratissimum* ức chế tất cả các loại vi khuẩn với đường

kính vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng 17 - 25 mm. Chủng *S. Typhimurium* kém nhạy hơn (D = 17 mm) so với 5 chủng còn lại.

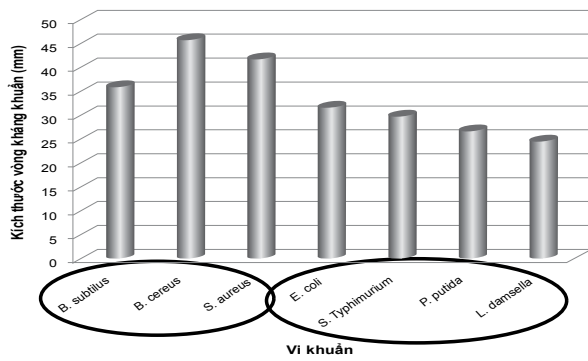
Tinh dầu húng quế *Ocimum basilicum* đặc biệt nhạy cảm với vi khuẩn Gram (+) *B. subtilis* với đường kính vòng kháng khuẩn D = 27 mm. Với các vi khuẩn còn lại, đường kính vòng kháng khuẩn dao động trong khoảng D = 3 - 18 mm.

Tinh dầu bạc hà *Mentha arvensis* có giá trị kích thước vòng kháng khuẩn D nằm trong khoảng 14 - 30 mm. Giá trị kích thước vòng kháng khuẩn lớn nhất là đối với vi khuẩn *S. aureus* và nhỏ nhất là vi khuẩn *S. typhimurium*.

Tinh dầu nghệ vàng *Curcuma longa* có đường kính vòng kháng khuẩn 15 - 22 mm.

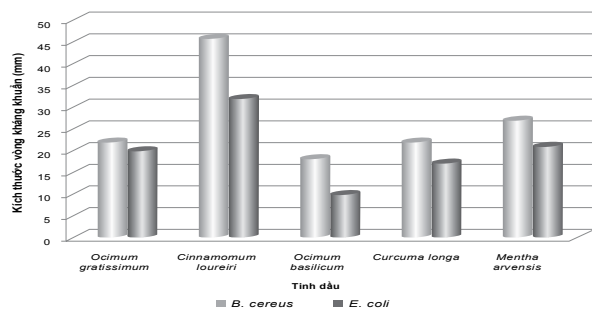
Tinh dầu quế có vòng kháng khuẩn 25 - 46 mm đối với tất cả các chủng. Vòng kháng khuẩn của Gram (+) *B. cereus* đạt 46 mm trong khi đối với Gram (-) *L. damsella* là 25 mm (Hình 2). Kết quả đạt được trong thí nghiệm này có tính chất tương đồng với một số công bố trên thế giới (Sikkema, J., 1994 và Burt, S., 2004).

Kết quả trên hình 2 cho thấy, kích thước vòng kháng khuẩn của tinh dầu *Cinnamomum loureiri* với các loại vi khuẩn Gram (+) lớn hơn so với vi khuẩn Gram (-). Tuy nhiên cũng có công bố rằng, vi khuẩn Gram (-) *A. hydrophila* đặc biệt nhạy cảm với hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu (Wan et al., 1998).

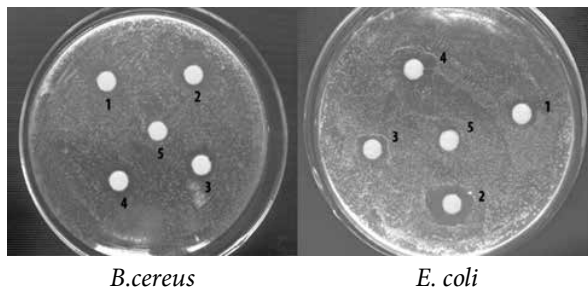


Hình 2. So sánh kích thước vòng kháng khuẩn của tinh dầu quế *Cinnamomum loureiri* với 4 vi khuẩn Gram (-) và 3 vi khuẩn Gram (+)

Vi khuẩn *Bacillus cereus* phân bố nhiều trong tự nhiên, nhiễm vào các loại thức ăn qua đêm hay trữ lạnh lâu, thường gây ngộ độc thực phẩm. *E. coli* cũng dễ dàng phân lập được từ các mẫu thực phẩm. Sự hiện diện của *E. Coli* trong mẫu chỉ thị khả năng có sự hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác trong thực phẩm. Các nghiên cứu tiếp theo có mục đích đánh giá khả năng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với 2 loài vi khuẩn này. So sánh vòng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với các khuẩn *B. cereus* và *E. coli* kết quả thể hiện trên hình 3 và 4.



Hình 3. So sánh kích thước vòng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *B. cereus* và *E. coli*.

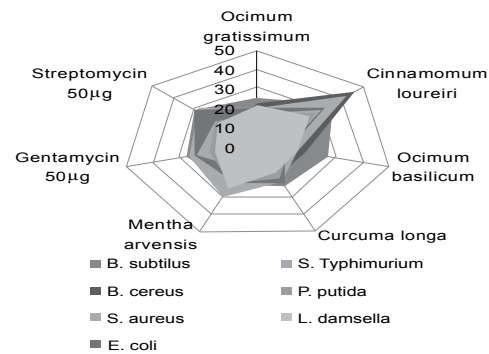


Hình 4. Hình ảnh vòng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với vi khuẩn

1: Tinh dầu hương nhu (*Ocimum gratissimum*); 2: Tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*); 3: Tinh dầu nghệ vàng (*Curcuma longa*); 4: Tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*); 5: Tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*)

Kết quả thu được trên hình 3 và 4 cho thấy kích thước vòng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu đối với vi khuẩn *B. cereus* lớn hơn so với vi khuẩn *E. coli*. Kết quả thí nghiệm đã tiến hành có tính tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu đã công bố (Cimanga et al., 2002; Delaquis et al., 2002; Pintore et al., 2002; Harpaz et al., 2003).

Kháng sinh streptomycin 50µg/ml nhạy với tất cả các loại vi khuẩn, kích thước vòng kháng khuẩn 16 - 30 mm, cao nhất là đối với *B. subtilis* và *E. coli*. Đối với trường hợp gentamycin 50 µg/ml kích thước vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng 16 - 27 mm. Như vậy 5 loại tinh dầu và 2 loại kháng sinh đều có khả năng kháng khuẩn cao trong đó tinh dầu quế *Cinnamomum loureiri* cao hơn (Hình 5). Kết quả đạt được cho thấy, việc nghiên cứu, sử dụng tinh dầu để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm hoặc thay thế chất kháng sinh là khả quan.



Hình 5. Khả năng kháng khuẩn của 5 loại tinh dầu và 2 kháng sinh đối với vi khuẩn

Theo hình 5, phần diện tích kháng khuẩn của tinh dầu quế *Cinnamomum loureiri* và tinh dầu bạc hà *Mentha arvensis* lớn hơn các tinh dầu còn lại, tương ứng với khả năng kháng khuẩn cao nhất của 2 loại tinh dầu này. Trong các thí nghiệm tiếp theo 2 loại tinh dầu quế và bạc hà được nghiên cứu xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với 2 loài vi khuẩn là *B. cereus* và *E. coli*.

3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*) và tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*)

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ tinh dầu đến khả năng kháng khuẩn, các thí nghiệm được thực hiện theo 2.2.2. Kết quả xác định số lượng khuẩn lạc tương đương số lượng tế bào sống khi đưa vào canh trường vi sinh vật các nồng độ tinh dầu khác nhau thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*)

Vi khuẩn	Nồng độ tinh dầu (%)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	% ức chế
<i>Bacillus cereus</i>	0	$2,8 \times 10^3$	
	0,25	$1,4 \times 10^2$	95
	0,5	0	100
<i>E. coli</i>	0	$1,42 \times 10^3$	
	0,5	$9,3 \times 10^2$	34,5
	1,0	$5,8 \times 10^2$	59,15
	1,5	$1,3 \times 10^2$	90,84
	2	0	100

Kết quả đạt được trong bảng 2 cho thấy độ mẫn cảm với tinh dầu quế (*Cinnamomum loureiri*) của *B. cereus* cao hơn *E. coli*.

Tỉ lệ MBC/MIC được dùng để xác định hoạt tính kìm khuẩn hoặc là diệt khuẩn của một tinh dầu. Nếu giá trị này nhỏ hơn 4 ($MBC/MIC \leq 4$), tinh dầu được coi là một chất diệt khuẩn. Nếu $MBC/MIC > 4$, tinh dầu được xác định là một chất kìm khuẩn. MIC và MBC của tinh dầu quế với 2 loài vi khuẩn thể hiện trên bảng 3.

Bảng 3. MIC và MBC của tinh dầu quế *Cinnamomum loureiri* của vi khuẩn

Vi khuẩn	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>B. cereus</i>	0,25	0,5	2
<i>E. coli</i>	0,5	2,0	4

Kết quả bảng 3 cho thấy tinh dầu quế *Cinnamomum loureiri* là chất diệt khuẩn đối với cả 2 loài vi khuẩn.

Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*), các thí nghiệm được thực hiện theo 2.2.2. Kết quả được thể hiện trên bảng 4.

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*)

Vi khuẩn	Nồng độ tinh dầu, (%)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	% ức chế
<i>B. cereus</i>	0	$3,6 \times 10^3$	
	0,25	$9,8 \times 10^2$	72,77
	0,5	$3,1 \times 10^2$	91,39
	1,0	$1,1 \times 10^2$	96,94
	1,5	0	100
<i>E. coli</i>	0	$4,4 \times 10^3$	
	0,5	$3,2 \times 10^3$	27,27
	2,5	$9,7 \times 10^2$	77,95
	3	$7,3 \times 10^2$	83,41
	4	$1,7 \times 10^2$	96,14
	4,5	0	100

Kết quả thu được từ các bảng 3 và 4 cho thấy độ mẫn cảm của *B. cereus* và *E. coli* với tinh dầu bạc hà cao hơn so với tinh dầu quế. Nồng độ tinh dầu bạc hà ức chế hoàn toàn vi khuẩn *B. cereus* là 1,5% và 4,5% với *E. coli*. MIC và MBC của tinh dầu bạc hà với 2 vi khuẩn nghiên cứu thể hiện trên bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định MIC và MBC tinh dầu bạc hà (*Mentha arvensis*)

Vi khuẩn	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>B. cereus</i>	0,25	1,5	6
<i>E. coli</i>	0,5	4,5	9

Với tỉ lệ MBC/MIC thu được cho thấy tinh dầu bạc hà là chất kìm khuẩn.

3.3. Xác định thời gian ức chế sinh trưởng của tinh dầu quế và bạc hà đối với *B. cereus* và *E. coli*

Để xác định thời gian tối thiểu tinh dầu có thể tiêu diệt hoàn toàn 2 vi khuẩn nghiên cứu, thí nghiệm được tiến hành như mục 2.2.3. Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng đến mật độ 10^8 CFU/ml, bổ sung tinh dầu quế và bạc hà nồng độ 0,25% cho *B. cereus* và 0,5% cho *E. coli*. Kết quả xác định số khuẩn lạc phát triển thể hiện trên bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian phơi nhiễm lên khả năng kháng khuẩn của tinh dầu

Tinh dầu	TG (phút)	VSV (CFU/ml)	
		<i>B. cereus</i> 10^3	<i>E. coli</i> 10^3
Quế	0	2,08	3,36
	10	0	0,2
	20	0	0
Bạc hà	0	2,52	5,36
	10	1,94	3,56
	20	1,1	1,48
	30	0,2	1,6
	40	0,12	1,12
	50	0	0,84
	60	0	0,4
90	0	0	

Kết quả đạt được trên bảng 6 cho thấy tinh dầu quế ức chế hoàn toàn với *B. cereus* sau thời gian 10 phút và với *E. coli* là 20 phút. Độ mẫn cảm của tinh dầu bạc hà với vi khuẩn thấp hơn so với tinh dầu quế. Tinh dầu bạc hà ức chế hoàn toàn *B. cereus* sau 40 phút và với *E. coli* thời gian ức chế hoàn toàn là 90 phút.

IV. KẾT LUẬN

Quá trình thực nghiệm cho thấy khả năng kháng khuẩn của một số tinh dầu phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chủng vi sinh vật, nồng độ, thời gian tiếp xúc. Kết quả cho thấy các tinh dầu quế, tinh dầu bạc hà có khả năng kháng khuẩn tốt nhất, cao hơn kháng sinh đối chứng. Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu quế với *B. cereus* là 0,25% và với *E. coli* là 0,5%. Tỷ lệ MBC/MIC thu được đã chỉ ra rằng, tinh dầu quế là chất diệt khuẩn và tinh dầu bạc hà là chất kìm khuẩn đối với *B. cereus* và *E. coli*.

Kết quả của các nghiên cứu cho thấy khả năng ứng dụng các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học như tinh dầu thay thế cho kháng sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Văn Kính và nhóm Nghiên cứu quốc gia của GARP- VN, 2010. *Phân tích thực trạng: sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại Việt Nam* p. 2-6.

Đỗ Tất Lợi, 2006. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* (94): 223-253.

Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155: 1749-1757.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66 (3): 410-417.

Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J., 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 15-19.

Sikkema, J., Bont J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 8022-8028.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17: 142-145.

Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J., 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 152-158 .

Zanil, A., Junior, C., 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Braz J. Sci.* 95: 367-373.

Study on the antimicrobial activity of essential oils

Nguyen Thi Mai Huong, Ho Tuan Anh

Abstract

This article presents research on the antimicrobial properties of five essential oils from *Ocimum gratissimum*, *Cinnamomum loureiri*, *Ocimum basilicum*, *Mentha arvensis*, *Curcuma longa* for *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. putida*, *L. damsella* compared with two antibiotics, gentamycin and streptomycin. Disc diffusion method was established so that all essential oils had antimicrobial ability, in which *Cinnamomum loureiri* showed the highest ability. It was determined that the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal time of *Cinnamomum loureiri* oil for *B. cereus* were 0.25% and 10 minutes, respectively, and for *E. coli* were 0.5%, 20 minutes, respectively. Based on the minimum bactericidal concentration/minimum inhibitory concentration ratio (MBC / MIC), *Cinnamomum loureiri* oil was determined as a disinfectant, and *Mentha arvensis* as a bacteriocin for *B. cereus* and *E. coli*. This study showed that some essential oils indicated a comparable effectiveness as an antibiotics.

Key words: Essential oil, antimicrobial, antibacterial ring, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

Ngày nhận bài: 2/7/2017
Ngày phản biện: 15/7/2017

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Thị Minh Tú
Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

NÂNG CAO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP VALIDAMYCIN-A TỪ CHỦNG *Streptomyces hygroscopicus* 11405 BẰNG ĐỘT BIẾN TẾ BÀO TRẦN

Vũ Thị Hạnh Nguyên¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy², Phí Quyết Tiến¹

TÓM TẮT

Validamycin A (Val-A) là chất kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside được sinh tổng hợp bởi chủng *Streptomyces hygroscopicus*. Mục đích nghiên cứu này là tạo tế bào trần và gây đột biến tế bào trần (TBT) chủng *S. hygroscopicus* 11405 bằng tia UV và N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) để nâng cao hiệu suất chủng sản xuất. TBT *S. hygroscopicus* 11405 được tạo tốt nhất khi phát triển ở đầu pha logarit có bổ sung 0,4% glycine và xử lý với lysozyme 1 mg/ml ở 37°C, 60 phút. Đột biến TBT chủng 11405 bằng tia UV không cho kết quả tốt, tuy nhiên gây đột biến bằng MNNG với nồng độ 0,1 mg/ml trong 30 - 40 phút tạo được tỷ lệ đột biến cao nhất. Sau khi xử lý đột biến TBT đã thu được 109 biến chủng được phân thành 5 typ màu, trong đó typ 1, 5 chiếm đa số, đạt tới 38,5 - 49,6%. Áp dụng quy trình gây đột biến bằng MNNG đã tạo được biến chủng *S. hygroscopicus* 11405-115 có hoạt tính Val-A cao hơn chủng gốc 70%. Thời điểm sinh tổng hợp kháng sinh cao nhất của biến chủng này là sau 48 giờ lên men đạt 6,87 mg/ml.

Từ khóa: Đột biến, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces hygroscopicus*, tế bào trần, validamycin-A

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Validamycin A (Val-A) là một chất kháng sinh nhóm aminoglycoside có hoạt tính kháng nấm được sinh tổng hợp chủ yếu bởi *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* (Liao *et al.*, 2009; Iwasa *et al.*, 1971) và *S. hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008 (Shen, 1988; Zhou *et al.*, 2014). Nhờ hiệu quả phòng trừ nấm cao cũng như an toàn cho con người và động vật, nên Val-A trở thành một trong những kháng sinh quan trọng nhất và được sử dụng rộng rãi để trừ bệnh đốm vằn hại lúa, ngô, bệnh đốm lá và thân lúa, ngô do *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* và *Sclerotium oryzae-sativa* gây nên. Ngoài ra, val-A còn trừ bệnh thối củ, thối rễ khoai tây, bông, cà chua, nấm hồng trên cây cao su và nhiều loại rau do nấm *R. solani* gây nên (Wang *et al.*, 2001). Val-A là chất kìm hãm yếu ($IC_{50} = 10^{-3}$ M) các enzyme thủy phân đường khác như maltase, isomaltase và saccharase trong ruột lợn. Trong *R. solani*, kháng sinh được vận chuyển nhanh đến sợi nấm và được glycosidase thủy phân thành validoxylamine A, đây là chất kìm hãm trehalase của nấm mạnh cả ở *in vitro* và *in vivo* (Kameda *et al.*, 1975). Trong tế bào nấm bệnh, trehalase xúc tác chuyển hóa trehalose thành đường glucose - nguồn năng lượng cho nấm phát triển. Do đó, dưới tác động của val-A, tế bào nấm sẽ tạo nhánh bất thường, bị khô dẫn và chết do không có khả năng tổng hợp glucose để sinh trưởng (Demain, 1974). Các chủng *S. hygroscopicus* có hoạt tính tổng hợp kháng sinh rất yếu, không mang tính ổn định và bền vững cao để hạn chế hình thành các sản phẩm phụ, rút ngắn thời gian lên men và giảm chi phí sản xuất. Do vậy, nghiên cứu này trình bày kết quả gây

đột biến ở chủng *S. hygroscopicus* 11405 dưới tác động của các tác nhân như tia UV, chất gây đột biến MNNG và lựa chọn những biến chủng có hoạt tính cao cho lên men sinh tổng hợp Val-A.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn *S. hygroscopicus* 11405 và chủng nấm kiểm định *Rhizoctonia solani* VP nhận được từ Bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường ISP2 (g/l): Cao nấm men 4; cao malt 10; dextrose 4; thạch 20 pH 7,3, nước cất 1000 ml. Môi trường lên men cơ bản FM3 (g/l): Bột ngô 90,0; bột đậu tương 40,0; cao nấm men 5,0; KH_2PO_4 1,0; pH 7,0; nước cất 1000 ml. Môi trường xác định hoạt tính kháng sinh A1 (g/l): Saccharose 1,0; cao thịt 5,0; pepton 10,0; thạch 8,0; pH 7,0, nước cất 1000 ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hoạt tính kháng sinh (HTKS)

Theo phương pháp màng ngược của Iwasa và cộng tác viên (1971). Hoạt tính Val-A được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC) tại Trung tâm Kỹ thuật I, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ.

2.2.2. Đánh giá sự biến động tự nhiên về HTKS của các khuẩn lạc (KL)

Đầu tiên xác định HTKS trung bình (X) của các khuẩn lạc, rồi từ đó xác định độ lệch chuẩn:

$$\delta = \sqrt{\sum(X_i - X)^2 / (n-1)}$$

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam