

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO QUẢN TRÁI CÂY CỦA MÀNG CELLULOSE VI KHUẨN TẨM CHITOSAN

Trần Thị Thanh Tiên¹, Phan Mỹ Hạnh, Trần Chí Hiếu, Lê Thị Thùy Nhi²

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Trường Đại học Công Nghiệp - Thành phố Hồ Chí Minh

² Phòng Công nghệ Vi sinh - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bacterial cellulose (BC) là một loại polysaccharide có cấu tạo tương tự cellulose thực vật do vi sinh vật sinh tổng hợp, trong đó *Komagataeibacter nataicola* là chủng có khả năng sinh tổng hợp tạo sinh khối cellulose vi khuẩn cao. Khảo sát ngưỡng đơn yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulose vi khuẩn từ chủng *K. nataicola* BC-B0007 cho thấy: chủng này sinh tổng hợp cellulose ở pH 4,0, tỷ lệ giống 20%, ở các ngưỡng giá trị sucrose 30 - 70 g/L, mật rỉ đường 0 - 50 g/L, thời gian nuôi từ 7 - 11 ngày. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *K. nataicola* BC-B0007 cho thấy lượng sinh khối khô cellulose vi khuẩn đạt cao nhất khi nuôi bằng công thức có thành phần: BC NUTRI 02 10 g/L, sucrose 70 g/L, mật rỉ đường 50 g/L, thời gian nuôi 11 ngày. Màng BC sau khi được xử lý với NaOH và acid citric có khả năng ngăn cản sự xâm nhập của các chủng *Escherichia coli*, *Geotrichum candidum*, *Staphylococcus aureus* cũng như khi để ngoài môi trường tự nhiên sau 72 giờ thử nghiệm. Màng BC kết hợp với chitosan 0,5% (BC-C 0,5%) có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Khi sử dụng màng BC-C để bảo quản cà chua, kết quả thí nghiệm cho thấy độ giảm khối lượng của cà chua được bảo quản bằng màng BC-C tăng ít hơn so với cà chua không bọc. Tổng số vi khuẩn hiếu khí ở cà chua được bọc bằng màng BC-C là $1,6 \times 10^3$ CFU/g, thấp hơn so với $2,93 \times 10^4$ CFU/g, $2,73 \times 10^4$ CFU/g lần lượt ở cà chua không bọc và cà chua được bọc bằng màng Ringo sau 21 ngày bảo quản. Tổng số nấm men, mốc ở cà chua được bọc bằng màng BC-C là $7,45 \times 10^3$ CFU/g, thấp hơn $2,88 \times 10^4$ CFU/g, $1,73 \times 10^4$ CFU/g lần lượt so với cà chua không bọc và cà chua được bọc bằng màng Ringo sau 21 ngày bảo quản. Qua đó cho thấy tiềm năng sử dụng màng cellulose vi khuẩn tẩm chitosan BC-C bảo quản trái cây tươi.

Từ khóa: BC-B0007, cellulose vi khuẩn, *Komagataeibacter nataicola*, màng bọc thực phẩm, bacterial cellulose.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là quốc gia Đông Nam Á có điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng thuận lợi, với khoảng 70% dân số làm nghề nông và diện tích trồng cây ăn quả khoảng 700000 ha, cho sản lượng hàng năm khoảng 7 triệu tấn quả các loại. Do đó chúng có tiềm năng rất lớn để phát triển sản xuất và xuất khẩu. Tuy nhiên, trong nhiều năm qua mức tồn thất trái cây sau thu hoạch của Việt Nam lên đến 45% và chưa có nhiều tiến triển mặc dù đã có nhiều nỗ lực đầu tư cho khâu bảo quản sau thu hoạch. Đa số trái cây hiện nay đều được bảo quản bằng các vật liệu polymer như polyethylene (PE), polyvinyl chloride (PVC), polystyrene,... chúng có thể giúp giữ tươi lâu hơn nhưng lại có hại cho sức khỏe người tiêu dùng và môi trường xung quanh. Hàm lượng chất dinh dưỡng của thực phẩm được bảo quản bằng các vật liệu polymer vẫn bị suy giảm trong quá trình bảo quản (Lê Thị Minh Thủy, 2008). Hơn nữa, thời gian phân hủy của các vật liệu polymer kéo dài, khó xử lý dẫn đến gây ô nhiễm môi trường trên cạn, dưới nước và có hại cho sức khỏe con người (Lê Hồ Khánh Hỷ và đồng tác giả, 2016). Do đó việc cấp bách hiện nay là tạo ra một loại màng bọc có nguồn gốc tự nhiên để phân hủy sinh học nhằm khắc phục các khuyết điểm của màng bọc polymer.

Komagataeibacter nataicola là vi khuẩn acetic, có thể sinh tổng hợp một lượng lớn cellulose vi khuẩn và chịu được nồng độ acid acetic cao, Gram âm, hình que, thẳng hoặc hơi cong, kích thước 0,5 - 1,0 μm , tế bào phân bố đơn lẻ hay theo cặp, hoặc dạng chuỗi, không di động và không sinh bào tử (Lisdiyanti *et al.*, 2006).

Cellulose vi khuẩn là một chuỗi polymer không phân nhánh bao gồm những gốc D-glucose nối với nhau bằng liên kết β -1,4-glucan. Những chuỗi glucan được vi khuẩn tổng hợp nối lại với nhau thành thớ sợi thứ cấp, có bề rộng 1,5 nm. Các thớ sợi thứ cấp kết lại thành vi sợi, những vi sợi tạo thành bó sợi. Những bó sợi tạo thành dải có chiều dày 3 - 4 nm và chiều dài 130 - 177 nm (Iguchi *et al.*, 2000). Các dải cellulose vi khuẩn có chiều dài từ 1 - 9 μm tạo thành cấu trúc mạng lưới dày đặc (Bielecki *et al.*, 2001).

Chitosan là chuỗi polysaccharide thu được từ quá trình deacetyl hóa chitin, hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, không độc và rẻ tiền (Nguyễn Thị Ngọc Tú, Phạm Thị Mai, 1995). Chitosan có những đặc tính ưu việt như độ tinh thấp, hoạt tính sinh học cao, có khả năng phân hủy, tương thích sinh học, hoạt tính kháng khuẩn cao (Rabea *et al.*, 2003).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo màng cellulose vi khuẩn từ chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 tẩm chitosan (màng BC-C) và khảo sát khả năng bảo quản trái cây tươi của màng này.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Môi trường BC NUTRI 02 sử dụng trong lên men tạo màng BC là sản phẩm khoa học được nghiên cứu bởi phòng Công nghệ Vi sinh thuộc bản quyền của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM. Các môi trường PDB, TSB, TSA được sản xuất bởi hãng Himedia, Merck. Thiết bị máy móc sử dụng trong nghiên cứu được sản xuất từ các hãng Carl Zeiss, Mettler toledo, Memmert, Thermo scientific.

Nhân giống chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007

Giống *Komagataeibacter nataicola* được trữ ở tủ đông -80°C trong dung dịch glycerol, khi cần sử dụng giống được hoạt hóa và tăng sinh trong môi trường chứa: BC NUTRI 02 10g/L, sucrose 70 g/L, pH 4 điều chỉnh bằng acid acetic. Quá trình tăng sinh diễn ra trong 7 ngày ở điều kiện tĩnh, nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến năng suất tạo màng cellulose

Tiến hành khảo sát 5 yếu tố gồm pH (3 - 7), tỷ lệ giống (5 - 30%), thời gian nuôi (5 - 15 ngày), nồng độ sucrose và mật rỉ đường (10 - 100 g/L). Môi trường được hấp khử trùng ở 115°C trong 20 phút, bổ sung 20% dịch giống lên men vào môi trường. Sau đó phân phối 30 ml hỗn hợp trên vào các hộp thí nghiệm đã hấp khử trùng. Quá trình lên men diễn ra ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Tiến hành thu màng, rửa và sấy màng đến khối lượng không đổi. Cân và lấy chỉ tiêu khối lượng màng cellulose khô.

Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tạo màng BC bằng phương pháp Full Factorial Design (FFD)

Thí nghiệm FFD được thiết kế nhằm nghiên cứu và xác định ảnh hưởng riêng lẻ từng yếu tố và mức độ tương tác qua lại giữa chúng đến kết quả thu được nhờ đó giảm bớt được số lượng thí nghiệm chung. Ba yếu tố ảnh hưởng đến năng suất tạo màng cellulose lần lượt gồm thời gian nuôi, nồng độ sucrose, nồng độ mật rỉ đường được chọn làm biến khảo sát ở 3 mức độ: mức trên (+), mức dưới (-), mức trung bình (0). Với mức trên (+) và mức dưới (-) dựa vào khoảng khảo sát từ các thí nghiệm trước. Mức trung bình (0) là giá trị trung bình cộng của mức trên (+) và mức dưới (-). Dựa vào kết quả thực tế thí nghiệm, xử lý kết quả trên bằng phần mềm JMP statistical Discovery 10.0 sẽ cho được phương trình hồi quy tuyến tính và tìm ra được nồng độ các yếu tố ảnh hưởng tới khối lượng cellulose. Dựa vào kết quả này sẽ tìm được công thức tối ưu lý thuyết.

Đánh giá hiệu quả công thức tối ưu theo lý thuyết so với thực tế

Tiến hành nuôi chủng *K. nataicola* BC-B0007 và thu nhận màng cellulose với thành phần môi trường lên men theo công thức tối ưu. Thu màng và sấy đến khối lượng không đổi.

Kiểm tra khả năng cản vi sinh vật của màng BC

Kiểm tra khả năng ngăn cản sự xâm nhập của các chủng *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 10231 và *G. candidum* qua màng BC bằng cách đặt màng BC khô lên trên bề mặt thạch. Đối với vi khuẩn, trải đều 0,1 ml dịch huyền phù trên màng, ủ ở 35°C trong 24 giờ. Đối với nấm, cấy tơ nấm đặt lên màng, ủ ở 25°C trong 48 giờ.

Kiểm tra khả năng cản vi sinh vật trong không khí qua màng BC bằng cách đặt màng khô lên trên bề mặt thạch, mở nắp và đặt đĩa này ở ngoài không khí trong 24 giờ, đóng nắp và ủ ở 35°C trong 24 giờ. Quan sát sự hiện diện của vi sinh vật ở phía trên và phía dưới màng.

Kiểm tra khả năng ức chế vi khuẩn của màng BC-Chitosan (BC-C)

Chuẩn bị màng BC tẩm chitosan bằng cách ngâm màng BC trong dung dịch chitosan 1, 2, 3, 4% trong 1 giờ, sấy màng ở 45°C bằng tủ sấy Memmert với tốc độ quạt 100. Tiến hành trải 0,1 ml dịch huyền phù vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* ($\sim 10^8$ CFU/ml) lên bề mặt thạch, rồi đặt các màng thử lên và ủ ở 35°C . Theo dõi và ghi nhận khả năng ức chế của vi khuẩn ở phía trên và dưới màng sau 24 và 72 giờ.

Đánh giá khả năng bảo quản trái cây của màng BC-C

Cà chua là một loại trái cây quan trọng được tiêu thụ nhiều trên toàn thế giới. Thời gian gần đây, việc tiêu thụ cà chua đã tăng lên do những lợi ích liên quan đến một số chất như carotenoids, vitamin C. Tuy nhiên, thời gian bảo quản của trái cà chua tương đối ngắn, thường từ 2 - 3 tuần. Do đó, cà chua phải được bảo quản đúng cách sau khi thu hoạch để duy trì chất lượng và tăng thời gian sử dụng.

Tiến hành thí nghiệm với mẫu ĐC (Cà chua không bọc màng), M1 (Cà chua được bọc màng BC-C), M2 (Cà chua được bọc màng Ringo). Các mẫu trên sẽ được bảo quản ở nhiệt độ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và khảo sát các chỉ tiêu sau:

Độ giảm khối lượng của mẫu: Sau 3 ngày cân khối lượng mẫu thí nghiệm bằng cân phân tích. Tính theo đơn vị phần trăm:

$$\text{Độ giảm khối lượng ngày thứ } N (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

Trong đó: m_1 là khối lượng mẫu đo được ngày đầu tiên, m_2 khối lượng mẫu đo được ngày thứ N.

Tổng số vi sinh vật hiếu khí: sau 0, 7, 14 và 21 ngày các mẫu thí nghiệm được xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 5165:1990 và TCVN 5166:1990.

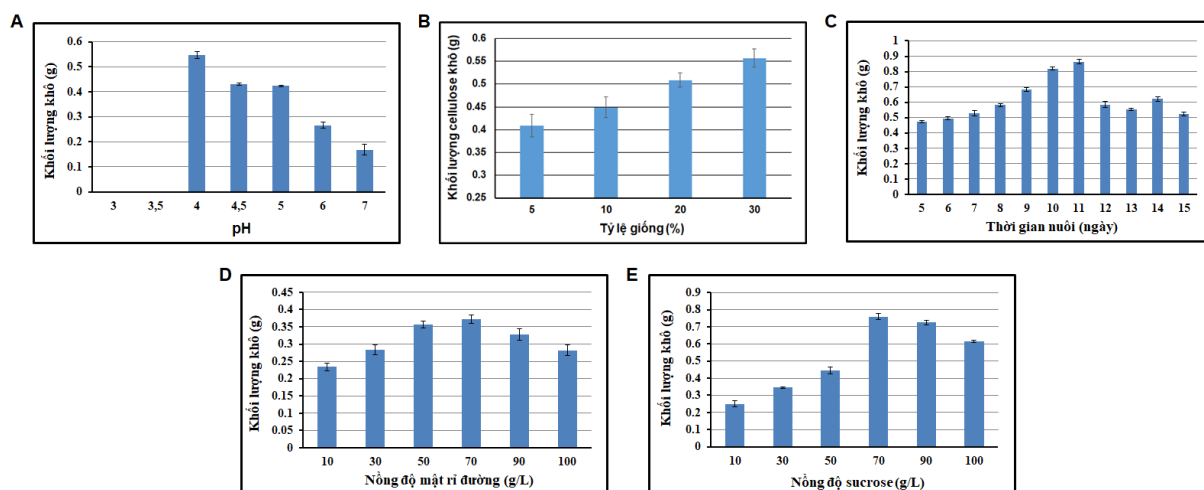
Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý thống kê, phân tích ANOVA bằng phần mềm Statgraphics và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 2013. Số liệu kết quả tối ưu hóa được xử lý bằng phần mềm JMP statistical Discovery 10.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến năng suất tạo màng cellulose

Ảnh hưởng của các yếu tố pH, tỷ lệ giống, thời gian nuôi, nồng độ sucrose và nồng độ mật rỉ đường đến năng suất tạo cellulose vi khuẩn do chủng *Komagataeibacter nataicola* BC-B007 sinh tổng hợp như trong hình 1.



Hình 1. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của A) pH, B) tỷ lệ giống, C) thời gian nuôi, D) nồng độ sucrose, E) nồng độ mật rỉ đường

pH thích thích hợp nhất đối với chủng *K. Nataicola BC-B0007* là pH 4 với khối lượng khô đạt $0,547 \pm 0,0013$ g/30 ml. Khi tăng pH từ 4 - 7 thì khối lượng cellulose khô giảm dần. Ở pH 3 và 3,5 không nhận thấy sự tạo màng cellulose (Hình 1A).

Khi tỷ lệ giống tăng thì khối lượng cellulose cũng tăng, trong đó tỷ lệ giống 30% cho khối lượng cellulose cao nhất với giá trị đạt $0,557 \pm 0,020$ g/30 ml. Lượng cellulose ở tỷ lệ giống 20% là $0,509 \pm 0,015$ g/30 ml, so với tỷ lệ giống 30% không có sự chênh lệch lớn (Hình 1B). Trong thực tế sản xuất, lượng giống càng cao càng tránh sự tạp nhiễm, tuy nhiên lượng giống càng cao càng đẩy giá thành sản phẩm lên cao. Do đó, chọn tỷ lệ giống 20% cho thí nghiệm tối ưu hóa.

Lượng cellulose tăng nhanh từ ngày lên men thứ 5 đến ngày thứ 11, với giá trị tăng từ 0,473 đến 0,865 g/30 ml. Tuy nhiên, từ ngày thứ 12 đến ngày 15 khối lượng cellulose khô lại giảm nhiều hơn so với ngày thứ 11 (Hình 1C). Chọn thời gian nuôi từ 7 - 11 ngày làm ngưỡng giá trị cho thí nghiệm tối ưu hóa.

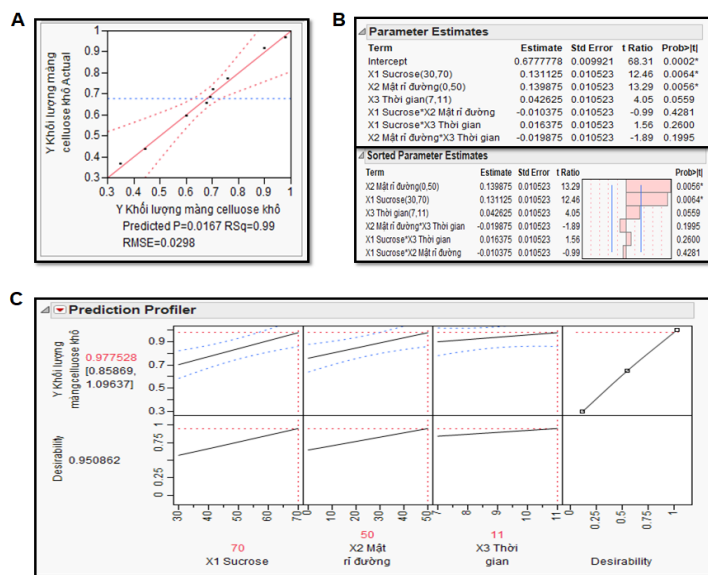
Trong thí nghiệm đơn yếu tố, khi tăng nồng độ sucrose từ 10 - 70 g/L thì khối lượng cellulose cũng tăng lên, tuy nhiên nếu tiếp tục tăng đến 90 và 100 g/L thì lượng cellulose lại giảm xuống (Hình 1D). Nồng độ sucrose tăng lên có xu hướng ức chế quá trình sinh tổng hợp cellulose vi khuẩn, do sự chênh lệch áp suất thẩm thấu của tế bào (Nguyễn Lâm Dũng, 1976). Nồng độ sucrose quá thấp sẽ không đủ cơ chất cho quá trình sinh tổng hợp cellulose. Chọn sucrose từ 30 - 70 g/L làm ngưỡng giá trị cho thí nghiệm tối ưu hóa.

Hình 1E cho thấy, khi tăng nồng độ mật rỉ đường từ 10 - 50 g/L thì lượng cellulose cũng tăng lên. Ở nồng độ 70 g/L, khối lượng cellulose cũng tăng nhưng ít, tiếp tục tăng lên 90 và 100 g/L lượng cellulose giảm xuống. Nồng độ mật rỉ đường tăng lên có xu hướng ức chế quá trình sinh tổng hợp cellulose do sự chênh lệch áp suất thẩm

thấu của tế bào (Nguyễn Lâm Dũng, 1976). Chọn mật rỉ đường từ 0 - 50 g/L làm ngưỡng giá trị cho thí nghiệm tối ưu hóa.

Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tạo màng BC bằng phương pháp FFD

Ở thí nghiệm tối ưu hóa môi trường nuôi cấy chủng *K. nataicola* BC-B0007, cố định các điều kiện nuôi cấy với BC NUTRI 02 10 g/L, pH 4, tỷ lệ giống 20%, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất tạo màng cellulose được tối ưu theo phương pháp FFD bao gồm 9 nghiệm thức. Ngưỡng giá trị của các yếu tố lần lượt là X_1 : nồng độ sucrose (30 - 70 g/L), X_2 : nồng độ mật rỉ đường (0 - 50 g/L), X_3 : thời gian nuôi (7 - 11 ngày). Kết quả tối ưu hóa xử lý bằng phần mềm JMP 10.0 như Hình 2.



Hình 2. Kết quả tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phần mềm JMP 10.0: A) So sánh khối lượng màng cellulose khô giữa phương trình lý thuyết và thực tế, B) Mức ảnh hưởng của các yếu tố đến khối lượng màng cellulose khô, C) Giá trị tối ưu của các yếu tố trong quá trình nuôi cấy

Hình 2A cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa các yếu tố thử nghiệm đến khối lượng cellulose khô có ý nghĩa ($P = 0,0167$) với giá trị $R^2 = 0,99$, cho thấy mức độ chính xác của phương trình lý thuyết đáp ứng được 99% so với kết quả thực tế.

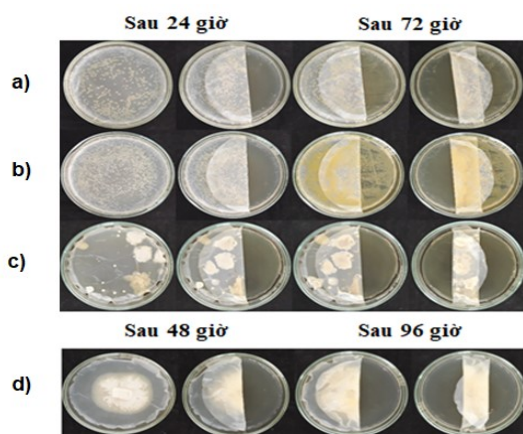
Phương trình hồi quy tuyến tính: $Y = 0,6777778 + 0,131125X_1 + 0,139875X_2 + 0,042625X_3 - 0,010375 X_1X_2 + 0,016375 X_1X_3 - 0,019875 X_2X_3$.

Kết quả hình 2B cho thấy, đối với 3 yếu tố thử nghiệm có 2 yếu tố gồm nồng độ mật rỉ đường và nồng độ sucrose ảnh hưởng đến năng suất tạo cellulose ở độ tin cậy 95% trong ngưỡng khảo sát. Nồng độ mật rỉ đường và sucrose có xu hướng tăng so với mức trung bình.

Công thức tối ưu theo lý thuyết: môi trường BC NUTRI 02 10g/L có bổ sung sucrose 70 g/L, mật rỉ đường 50 g/L, thời gian nuôi 11 ngày, pH 4, tỷ lệ giống 20% (Hình 2C).

Đánh giá hiệu quả công thức tối ưu theo lý thuyết

Để kiểm tra sự sai số giữa mô hình lý thuyết và thực tế, chúng tôi tiến hành nuôi và thu nhận cellulose với thành phần môi trường BC NUTRI 02 10 g/L có bổ sung sucrose 70 g/L, mật rỉ đường 50 g/L, thời gian nuôi 11 ngày, tỷ lệ giống 20%, pH 4. Khối lượng cellulose khô sau 5 lần lặp lại đạt 1,015 g/30 ml môi trường, giá trị này nằm trong khoảng giá trị lý thuyết 0,85869 - 1,0963 (Hình 2C). Điều này chứng tỏ công thức tối ưu theo lý thuyết có thể áp dụng vào thực tế sản xuất.



Hình 3. Khả năng cản vi sinh vật của màng BC
a) Ức chế *E. coli*, b) Ức chế *S. aureus*, c) Ức chế vi sinh vật trong không khí, d) Ức chế *G. candidum*

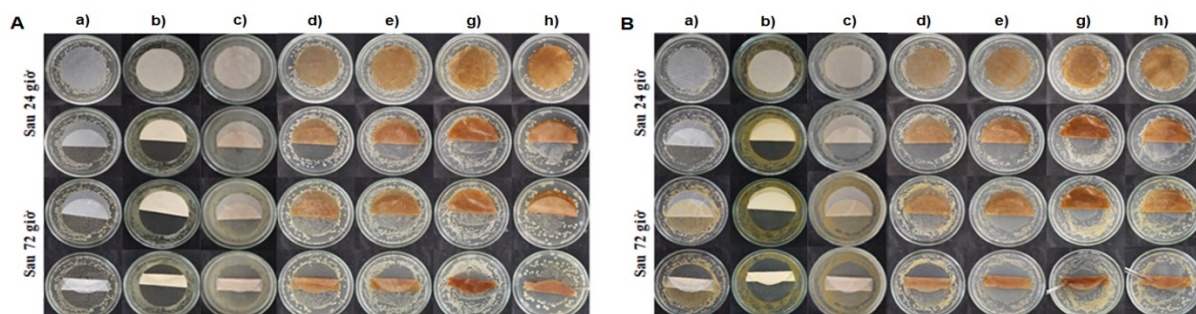
Đánh giá khả năng cản và ức chế vi sinh vật của màng BC đối với vi sinh vật

Sau 11 ngày nuôi cấy thu màng, xử lý với NaOH 3% trong 16 giờ và acid citric 0,5% trong 24 giờ thu được màng có màu vàng nhạt, mùi dịu, màng được sử dụng cho thử nghiệm cản khuẩn.

Kết quả sau 24 và 72 giờ nuôi ủ, phía trên màng vi khuẩn vẫn phát triển bình thường, phía dưới màng không thấy sự hiện diện của khuẩn (Hình 3a, 3b, 3c). Đối với nấm, sau 72 và 96 giờ phía trên màng tơ nấm vẫn phát triển bình thường, phía dưới màng không có (Hình 3d). Chứng tỏ, màng BC có khả năng cản vi sinh vật thử nghiệm (*E. coli*, *S. aureus*, *G. candidum*) đại diện cho nhóm gram dương, gram âm và vi nấm cũng như các vi sinh vật trong không khí, mặc dù vi sinh vật vẫn có thể phát triển trên màng nhưng không thể

mọc xuyên qua màng, kết quả này tương tự với kết quả của Bùi Thị Mỹ Duyên và đồng tác giả (2019). Từ kết quả này nhận thấy vi sinh vật vẫn có thể phát triển trên bề mặt BC nhưng không thể đi xuyên qua lớp BC để phát triển dưới bề mặt thạch.

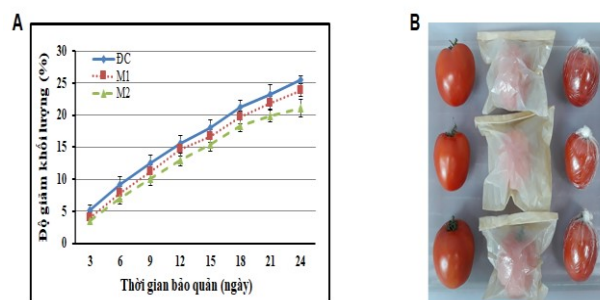
Dựa vào hình 4A và 4B sau 24 và 72 giờ, ở mẫu ĐC (-) khuẩn mọc nhiều ở cả phía trên và dưới màng (Hình a), ĐC (+) không có sự hiện diện của khuẩn (*E. coli*, *S. aureus*) ở cả phía trên và dưới màng (Hình b), chứng tỏ chitosan có khả năng ức chế sự sinh trưởng của khuẩn. Màng BC có tẩm chitosan ở các nồng độ khác nhau sau 24 và 72 giờ phía trên màng không có sự xuất hiện của khuẩn, phía dưới màng hầu như đã ức chế được sự phát triển của khuẩn. Đặc biệt, ở BC-C 0,5% phía dưới màng hầu như không có sự xuất hiện của khuẩn và tạo ra được vùng ức chế khuẩn rõ rệt sau 24 và 72 giờ (Hình c). Ở các nồng độ chitosan 1%, 2%, 3%, 4% (Hình d, e, g, h) màng BC-C bị khô và nhăn, dẫn đến màng này khó tiếp xúc với bề mặt thạch nên khuẩn vẫn có thể phát triển ở những nơi màng không tiếp xúc. Ở đây, chúng tôi chọn chitosan 0,5% tẩm vào màng BC để tiến thí nghiệm bảo quản trên trái cây.



Hình 4. Khả năng ức chế vi sinh vật của màng BC-Chitosan (BC-C) trên *E. coli* (A) và *S. aureus* (B)
a) ĐC (-): màng BC, b) ĐC (+): giấy + chitosan 2%, c) màng BC-C 0,5%, d) màng BC-C 1%, e) màng BC-C 2%, g) màng BC-C 3%, h) màng BC-C 4%.

Đánh giá khả năng bảo quản trái cây của màng BC tẩm chitosan 0,5% (BC-C 0,5%)

Về cơ bản sự hao hụt trong trái cây là do quá trình mất nước và do sự hô hấp giữa các chất hữu cơ có sẵn trong trái cây gọi là sự giảm khối lượng tự nhiên (Lê Văn Tân và đồng tác giả, 2008).



Hình 5. Chỉ tiêu đánh giá khả năng bảo quản trái cây của màng BC-C 0,5%. (A) Độ giảm khối lượng của cà chua qua từng ngày, (B) Hình ảnh quả bảo quản cà chua

Nhìn chung, phần trăm độ giảm khối lượng của các mẫu có xu hướng tăng và có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$. Qua hình 5A, phần trăm độ giảm khối lượng của mẫu ĐC (mẫu không bọc màng) tăng cao nhất qua từng ngày, sau đó đến mẫu M1 (cà chua được bọc màng BC-C 0,5%) và cuối cùng là mẫu M2 (cà chua được bọc màng Ringo). Màng Ringo có độ giảm khối lượng thấp hơn màng BC-C 0,5% khi bảo quản cà chua là do màng Ringo với các lỗ siêu nhỏ dẫn đến làm bí hơi nước trên màng nên khối lượng trái cà chua không giảm nhiều. Đối với màng BC-C có các lỗ màng từ 100 - 200 nm, độ thoáng khí cao hơn nên đã giải phóng bớt nước

ra bên ngoài dẫn đến khối lượng giảm nhiều hơn. Nhờ đặc điểm này, những trái cà chua được bảo quản bằng màng BC-C 0,5% không bị hư nhanh như màng Ringo.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn hiếu khí khuẩn và số lượng nấm men, mốc có trong mẫu qua từng ngày. Các chữ cái viết thường khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Tổng số vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)				Tổng số nấm men-mốc (CFU/g)			
Thời gian (Ngày)	ĐC	M1	M2	Thời gian (Ngày)	ĐC	M1	M2
0	7567 ^a ±1178	7567 ^a ±1178	7567 ^a ±1178	0	7050 ^a ±1785	7050 ^a ±1785	7050 ^a ±1785
7	9000 ^b ±1789	4000 ^a ±2098	7000 ^b ±2098	7	11000 ^b ±2500	2000 ^a ±1414	5000 ^b ±2757
14	13500 ^b ±2074	1250 ^a ±281	11100 ^b ±1124	14	20350 ^b ±2903	6300 ^a ±1794	11050 ^b ±1618
21	30733 ^b ±2930	1600 ^a ±775	28850 ^b ±2856	21	36200 ^b ±2750	7450 ^a ±1358	24750 ^b ±2879

Trái cây chứa nhiều nước và các chất dinh dưỡng, đây chính là môi trường thích hợp cho vi sinh vật phát triển. Đồng thời trong quá trình bảo quản theo thời gian sẽ hình thành những biến đổi cơ bản trong trái cây, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật xâm nhập vào và phân hủy bên trong. Kết quả bảng 1 cho thấy, ở mẫu ĐC lượng vi khuẩn và nấm men, mốc có xu hướng tăng lên và tăng nhiều nhất, đến mẫu M2 và cuối cùng là mẫu M1. Mẫu M1 sử dụng màng BC-C 0,5% cho hiệu quả rất tốt trong việc ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn và nấm men, mốc. Mẫu M2 cũng phần nào làm giảm sự phát triển của vi sinh vật nhưng ít hơn so với mẫu M1, điều này cho thấy màng Ringo chỉ có khả năng ức chế vi sinh vật trong một khoảng thời gian nhất định. Màng bọc thực phẩm Ringo có các lỗ siêu nhỏ nên vẫn có độ thoáng khí, trong trường hợp dùng bì nylon thông thường hoàn toàn không thoáng khí thì trái cây tươi dễ bị úng chỉ sau một thời gian ngắn bảo quản.

KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 có khả năng sinh tổng hợp cellulose tốt trên môi trường nuôi cấy có công thức như sau: BC NUTRI 02 10g/L, sucrose 70 g/L, mật rỉ đường 50 g/L, giống 20%, pH 4, thời gian nuôi 11 ngày, điều kiện tĩnh, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Màng BC không tẩm hoạt chất cũng đã có khả năng cản không cho vi sinh vật thâm nhập. Màng BC tẩm chitosan 0,5% có khả năng ức chế một phần sự phát triển của *E. coli* và *S. aureus*. Như vậy, màng BC-C 0,5% có thể dùng làm màng bọc bảo quản cà chua, chứng minh tiềm năng ứng dụng để bảo quản các loại trái cây khác phục vụ công tác bảo quản sau thu hoạch, cùng với các ưu điểm như có khả năng phân hủy sinh học, độ thông thoáng cao, không gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người, giảm nguy cơ sinh trưởng của mầm bệnh và làm giảm tỉ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên ở quả trong quá trình bảo quản. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi chưa xét đến các loại trái cây dễ dập nát vì màng BC có khả năng hút và giữ nước, cũng chưa nghiên cứu tạo lớp chống thấm cho màng do vậy đây là vấn đề cần tiếp tục được nghiên cứu.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng Công nghệ Vi sinh thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã cho phép và tạo điều kiện thuận lợi, hỗ trợ cơ sở vật chất để tôi có thể thực hiện nghiên cứu này, cảm ơn tiến sĩ Phan Mỹ Hạnh, thạc sĩ Trần Chí Hiếu, thạc sĩ Lê Thị Thùy Nhi đã hướng dẫn và hỗ trợ tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, Kalinowska H (2001). Bacterial cellulose. *Institute of Technical Biochemistry. Technical Chemistry of Lodz Stefanowskiego*, 37-46.
- Bùi Thị Mỹ Duyên, Phan Mỹ Hạnh, Trần Chí Hiếu, Lê Thị Thùy Nhi (2019). Nghiên cứu tạo màng cellulose kháng khuẩn từ chủng vi khuẩn *Komagataeibacter nataicola* BC-B0007 hướng đến ứng dụng điều trị bỏng. *Tuyển tập báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 386-393.
- Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *J Material Sci* 35 (2):261-270.
- Lê Hồ Khánh Hỷ, Nguyễn Thu Hồng, Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ, Phan Bảo Vy, Đoàn Thị Thiết (2016). Chế tạo màng chitosan/glycerol và chitosan/glycerol bổ sung nanochitosan trong bảo thực phẩm cá thu. *Tuyển tập nghiên cứu biển*, 22:48-58.
- Lê Thị Minh Thùy (2008). Nghiên cứu phối trộn chitosan-gelatin làm màng bao thực phẩm bao gói bảo quản phi lê cá ngừ đại dương. *Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1:147-153.
- Lê Văn Tấn, Nguyễn Thị Hiền, Hoàng Thị Lệ Bằng, Quẩn Lệ Hà (2008). Công nghệ bảo quản và chế biến rau quả. *Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật*.
- Lisdiyanti P, Navarro RR, Uchimura T, Komagata K (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56 (Pt 9):2101-2111.
- Nguyễn Lân Dũng (1976). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội*, tập 1-2-3.
- Nguyễn Thị Ngọc Tú, Phạm Thị Mai (1995). Nghiên cứu ứng dụng chitosan dùng trong y tế. *Tạp chí Dược học*, 14-16.
- Rabea EL, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6):1457-1465.

INVESTIGATION FOR FRUIT PRESERVATION ON BACTERIAL CELLULOSE-CHITOSAN FILMS

Trần Thị Thanh Tiên¹, Phan My Hanh, Tran Chi Hieu, Le Thi Thuy Nhi^{2,*}

¹ Institute of Biotechnology and Food Technology - Industrial University of Ho Chi Minh City

² Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Bacterial cellulose (BC) is a polysaccharide that has similar structure to plant cellulose, synthesized by different types of microorganisms, in which *K. nataicola* is a potential strain which has the capability of biosynthesis to produce high yield of bacterial cellulose. The results of single factor (OFAT) experiments showed that *K. nataicola* BC-B0007 produces high quantity of bacterial cellulose at pH 4,0, seeding rate of 20%, sucrose concentration 30 - 70 g/L, molasses 0 - 50 g/L, cultivated from 7 - 11 days. Optimizing the medium for cultivating of *K. nataicola* BC-B0007 showed that the dried bacterial cellulose biomass was highest at: BC NUTRI 02 10 g/L, sucrose 70 g/L, molasses 50 g/L, cultivating time 11 days. The BC film after being treated with NaOH and citric acid had the ability to prevent the penetration of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum* strains as well as other microorganisms when placing it in the natural environment after 72 hours of testing. The BC film combined with chitosan 0,5% (BC-C 0,5%) had the ability to inhibit the growth and development of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. When using BC-C film for tomato preservation, the experimental results showed that the weight reduction of tomatoes which was preserved by BC-C film less than unwrapped tomatoes. The total colony count of aerobic bacteria in tomatoes wrapped with BC-C film after 21 days of storage was $1,6 \times 10^3$ CFU/g, which was less than $2,93 \times 10^4$ CFU/g, $2,73 \times 10^4$ CFU/g of unwrapped tomatoes and tomatoes wrapped by Ringo films respectively. The total colony count of yeasts in tomatoes wrapped with BC-C film after 21 days of storage was $7,45 \times 10^3$ CFU/g, which was less than $2,88 \times 10^4$ CFU/g, $1,73 \times 10^4$ CFU/g of unwrapped tomatoes and tomatoes wrapped by Ringo films respectively. Thereby this research shows the potential of using bacterial cellulose-chitosan films (BC-C) to preserve fresh fruits.

Keywords: BC-B0007, Bacterial cellulose (BC), *Komagataeibacter nataicola*, Food wrap.

* Author for corresspondence: Tel +84-09 8488 8320; Email: hanheus@gmail.com