

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM MỐC *Aspergillus niger* CỦA TINH DẦU BẠC HÀ, HÚNG QUẾ, VÀ TRÀM TRONG CÁC CHẤT NHũ HÓA KHÁC NHAU

Liêu Mỹ Đông<sup>1,3,4\*</sup>, Nguyễn Thị Thanh Bình<sup>1</sup>, Phương Thảo Vy<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Hòa<sup>1</sup>, Huỳnh Ngọc Anh Thư<sup>1</sup>, Đặng Thị Kim Thúy<sup>2</sup>, Nguyễn Thúy Hương<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>4</sup> Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng kháng nấm mốc *Aspergillus niger* của tinh dầu bạc hà, tinh dầu húng quế, và tinh dầu tràm có nguồn gốc Việt Nam. Tinh dầu được pha loãng trong DMSO 1% (v/v) hoặc Tween 80 1% (v/v) ở các nồng độ khác nhau. Hoạt tính kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và ức chế sự phát triển hệ sợi nấm (MGI%). Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả kháng nấm phụ thuộc vào loại tinh dầu và chất nhũ hóa. Ở chất nhũ hóa DMSO, đường kính vòng kháng nấm đạt được từ 4,33 mm đến 18,66 mm với nồng độ ức chế tối thiểu đạt được ở cả ba tinh dầu là 50  $\mu$ L/mL, trong khi ở chất nhũ hóa là Tween 80 là 6,66 mm đến 27mm với nồng độ ức chế tối thiểu ở tinh dầu tràm là 50 và 25  $\mu$ L/mL ở hai tinh dầu còn lại. Khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi cho thấy chất nhũ hóa ảnh hưởng đáng kể tới hiệu quả ức chế của các loại tinh dầu trong khảo sát. Tween 80 cho thấy là chất nhũ hóa tốt đối với ba loại tinh dầu trong đó khả năng ức chế tinh dầu bạc hà và húng quế ở nồng độ 200 ppm đạt tương ứng 25% và 29,44%. Với khả năng tạo nhũ tương tốt, Tween 80 cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bảo quản nông sản.

*Từ khóa:* *Aspergillus niger*, chất nhũ hóa, kháng nấm, sau thu hoạch, tinh dầu.

## MỞ ĐẦU

Tổn thất sau thu hoạch là một trong những nguyên nhân chính gây thất thoát nông sản trong đó nấm mốc được xem là một trong những nguyên nhân chính (Dharini *et al.*, 2014). Có nhiều loại nấm mốc khác nhau được xem là nguyên nhân gây hư hỏng nông sản sau quá trình thu hoạch, trong đó *Aspergillus niger*, nhận được nhiều sự quan tâm nghiên cứu (Lieu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019). Vì vậy, việc ức chế nấm mốc gây hư hỏng là cần thiết. Có nhiều hướng tiếp cận khác nhau được nghiên cứu nhằm ức chế các chủng nấm mốc gây hư hỏng trong đó tinh dầu được xem là trong những giải pháp bền vững trong bảo quản nông sản đang nhận được nhiều quan tâm là tinh dầu từ thực vật. Tinh dầu có nguồn gốc thực vật được chứng minh khả năng kháng vi sinh vật phổ rộng, an toàn và được ứng dụng trong bảo quản trái cây (Dharini *et al.*, 2014; Lieu *et al.*, 2021). Bên cạnh đó, hiệu quả kháng nấm còn phụ thuộc vào loại tinh dầu, nơi trồng và mùa thu hoạch,... Tuy nhiên, sự kỵ nước và mùi mạnh của tinh dầu có ảnh hưởng đáng kể đến việc sử dụng tinh dầu trong thực phẩm (Morten *et al.*, 2012). Trong bảo quản trái cây, tinh dầu ở nồng độ cao khiến cho quá trình hư hỏng quả diễn ra nhanh do tác động của tinh dầu lên vỏ quả (Lieu *et al.*, 2021). Vì vậy, trong ứng dụng bảo quản thực phẩm, tinh dầu thường được pha loãng đến nồng độ phù hợp nhằm đảm bảo hiệu quả kháng nấm cũng như hạn chế tác động của tinh dầu tới thực phẩm. Để đạt được điều này, các chất nhũ hóa trong đó Dimethylsulfoxide (DMSO) và Tween 80 thường được sử dụng (Verica *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Các chất nhũ hóa giúp phân tán tinh dầu trong môi trường, giúp tinh dầu dễ dàng tiếp xúc và tác động lên tế bào vi sinh vật, từ đó gia tăng hiệu quả kháng nấm. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các chất tạo nhũ tương lên hiệu quả kháng nấm của các tinh dầu chưa được công bố đầy đủ. Trong nghiên cứu này, hiệu quả kháng nấm *A. niger* của ba loại tinh dầu bao gồm tinh dầu bạc hà, húng quế và tràm có nguồn gốc Việt Nam trong hai loại nhũ tương là DMSO và Tween 80 được khảo sát thông qua đánh giá hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, ức chế sự phát triển hệ sợi nấm mốc và ức chế sự sinh trưởng của nấm *A. niger*.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng *Aspergillus niger* được phân lập tại Đà Lạt, Lâm Đồng từ các nguồn bơ bị hư hỏng tự nhiên ở vườn. *A. niger* được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) ở 30°C trong 9 ngày. Bào tử sau đó được thu nhận bằng môi trường ở mật độ 5 Log CFU/mL.

Tinh dầu bạc hà, tinh dầu húng quế, và tinh dầu trầm được chiết xuất theo phương pháp lôi cuốn hơi nước và được bảo quản trong lọ kín. Các tinh dầu được pha loãng trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Duchefa) 1% (v/v) hoặc Tween 80 (Xilong) 1% (v/v) ở các nồng độ khác nhau và được sử dụng cho các thử nghiệm kháng nấm.

**Phương pháp nghiên cứu**

**Khảo sát hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên thạch**

Khảo sát đánh giá hoạt tính kháng nấm được tiến hành theo mô tả của Lieu và đồng tác giả (2021) với vài thay đổi được tóm tắt như sau. Sinh khối *A. niger* sau quá trình nuôi cấy được kiểm tra mật độ trên buồng đếm hồng cầu và hiệu chỉnh đến nồng độ 5 log bào tử/mL. Huyền phù thu được sẽ được trải lên môi trường thạch (PDA). Sau đó nhỏ 10 µL hệ nhũ tương có chứa tinh dầu ở các nồng độ khác nhau lên bề mặt thạch, các dung môi không chứa tinh dầu được dùng làm đối chứng. Các đĩa petri sau đó được ủ ở 35 °C. Sau 24 giờ ủ, các đĩa petri được lấy ra kiểm tra đường kính vòng kháng nấm.

**Khảo sát ảnh hưởng của tinh dầu lên sự sinh trưởng của hệ sợi *A. niger***

Ảnh hưởng của các loại tinh dầu lên sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm mốc được tiến hành theo mô tả của Boubaker và đồng tác giả (2016). Tinh dầu pha loãng trong Tween 80 (1% v/v) hoặc trong DMSO (1% v/v) được bổ sung vào môi trường PDA để đạt nồng độ tinh dầu 100 ppm và 200 ppm. Bào tử *A. niger* được cấy vào giữa mỗi đĩa và được ủ ở 35 °C. Đường kính của khuẩn lạc được đo sau mỗi 24 giờ. Các thí nghiệm được đánh giá khi khuẩn lạc mẫu đối chứng phát triển đến mép của đĩa. Chỉ số kháng nấm (MGI) được tính dựa trên công thức:  $MGI (\%) = (C-T)/T \times 100\%$ . Trong đó T là kích thước của khuẩn lạc trong đĩa thí nghiệm, C là kích thước của khuẩn lạc trong đĩa đối chứng.

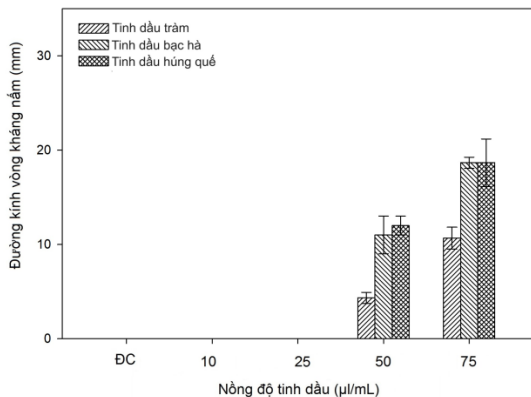
**Xử lý thống kê**

Các nghiệm thức của thí nghiệm được lặp lại ba lần nhằm xác định giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và kiểm định Student–Newman–Keuls, Tukey HSD dùng để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm. Số liệu được xử lý thông qua phần mềm Statgraphics centurion phiên bản 15.1.

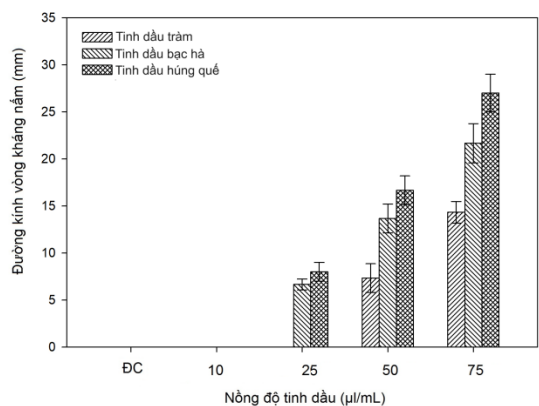
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của DMSO và Tween 80 tới hiệu quả kháng nấm *A. niger* của các loại tinh dầu**

Ảnh hưởng của ba loại tinh dầu quế trong hệ nhũ DMSO và Tween 80 được trình bày ở Hình 1 và 2. Kết quả thu được cho thấy có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,05$ ) về khả năng kháng nấm của các loại tinh dầu trong đó tinh dầu trầm cho hiệu quả kháng nấm thấp nhất. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, DMSO và Tween 80 có ảnh hưởng đáng kể tới hiệu quả kháng nấm của tinh dầu trong đó Tween 80 giúp cải thiện đáng kể hiệu quả kháng nấm của cả ba loại tinh dầu (Hình 1 và 2). Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu húng quế và bạc hà trong DMSO và Tween 80 đều đạt lần lượt 50 µL/mL và 25 µL/mL, trong khi ở tinh dầu trầm cho nồng độ ức chế tối thiểu ở cả hai chất nhũ hóa là 50 µL/mL.



Hình 1. Ảnh hưởng của DMSO tới hiệu quả kháng nấm của các loại tinh dầu



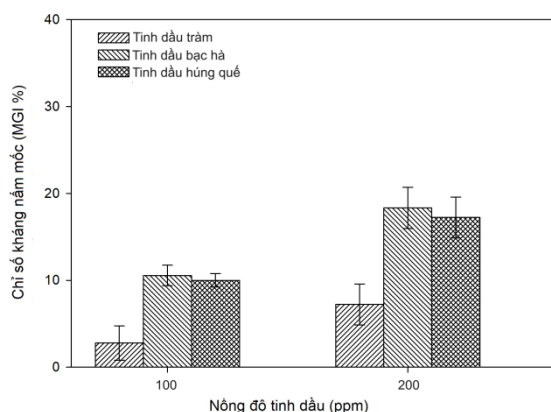
Hình 2. Ảnh hưởng của Tween 80 tới hiệu quả kháng nấm của các loại tinh dầu

Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, tinh dầu có chứa các thành phần kháng nấm có thể chống lại các loại nấm gây hư hỏng trái cây (Combrinck *et al.*, 2011). Theo báo cáo của Sukatta và đồng tác giả (2008) tinh dầu quế ở nồng độ 10 µl cho kết quả kháng nấm là 100% đối với *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *Lasiodiplodia theobromae*. Một trong những cơ chế kháng nấm của tinh dầu là tác động bằng cách phân cắt lớp màng lipid của tế bào nấm mốc, dẫn đến thay đổi tính thấm đối của ion H<sup>+</sup> và K<sup>+</sup> (Dharini *et al.*, 2014).

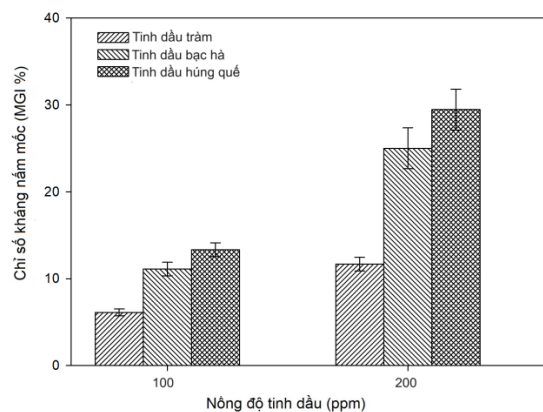
Khả năng kháng nấm của tinh dầu đạt được khi tinh dầu có thể tiếp xúc với vi sinh vật. Vì vậy chất tạo nhũ ảnh hưởng đến chất lượng kháng nấm của tinh dầu. Chất nhũ hóa ảnh hưởng đáng kể đến tính chất nghiên cứu và độ ổn định của tinh dầu (Gorjian *et al.*, 2022). Do đặc tính kỵ nước của tinh dầu khiến cho khi pha loãng tinh dầu gặp khó khăn vì vậy sử dụng hệ nhũ giúp pha loãng tinh dầu tốt hơn. Theo báo cáo trước đây khi sử dụng chất nhũ giúp tinh dầu có độ ổn định tính chất vật lý tốt, sự phân tán ổn định (El-Baroty *et al.*, 2010). Sự phân bố kích thước của tinh dầu cũng có ảnh hưởng đến tính chất kháng nấm của tinh dầu. Nhũ tương có chứa tinh dầu có khả năng phá vỡ và thâm nhập vào cấu trúc lipid của thành tế bào vi khuẩn, dẫn đến sự biến tính protein và phá hủy màng tế bào sau đó làm thay đổi hình dạng và chết tế bào (Muhammad *et al.*, 2017). Kết quả thu được từ khảo sát cho thấy, Tween 80 giúp tinh dầu phân tán tốt hơn, từ đó gia tăng hiệu quả kháng nấm so với chất nhũ hóa DMSO (Hình 1 và 2).

### Ảnh hưởng của DMSO và Tween 80 tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu

Khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi của *A. niger* của các loại tinh dầu được trình bày ở Hình 3 và 4. Kết quả thu được cho thấy, sau 6 ngày ủ trên môi trường PDA, kích thước khuẩn lạc nấm mốc trên đĩa đối chứng đạt 90 mm, trong khi ở mẫu có chứa tinh dầu cho thấy kích thước của đường kính khuẩn lạc nấm mốc giảm đáng kể thông qua chỉ số MGI%. Ở nồng độ 100 ppm, giá trị MGI% của tinh dầu bạc hà, húng quế và trầm trong DMSO lần lượt đạt 10,55%; 10%; và 2,77%, trong khi ở mẫu Tween 80 đạt lần lượt là 11,11%; 13,33%; và 6,11% (Hình 3 và 4). Ở nồng độ 200 ppm cho thấy hiệu quả ức chế hệ sợi tăng đáng kể. Giá trị MGI% của tinh dầu bạc hà, húng quế và trầm trong DMSO lần lượt đạt 18,33%; 17,22%; và 7,22%, trong khi ở mẫu Tween 80 đạt lần lượt là 25%; 29,44%; và 11,67% (Hình 3 và 4).



Hình 3. Ảnh hưởng của DMSO tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu



Hình 4. Ảnh hưởng của Tween 80 tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu

Tinh dầu và các thành phần của chúng có tác động đáng kể tới sự phát triển hệ sợi nấm mốc. Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, tinh dầu húng quế hòa tan trong acetone có thể ức chế được hoàn toàn hệ sợi nấm *A. flavus* ở nồng độ 1000 ppm (Ashok *et al.*, 2011). Ngoài ra, nồng độ tinh dầu cần thiết để ức chế sự sản sinh độc tố thấp hơn 50% so với nồng độ cần thiết để hoàn toàn ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm (Ashok *et al.*, 2011). Kết quả thu được từ khảo sát cho thấy vai trò của các chất nhũ hóa lên hiệu quả kháng nấm của tinh dầu (Hình 1, 2, 3 và 4).

## KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát thu được cho thấy, các tinh dầu bạc hà, húng quế và trầm đều cho thấy khả năng ức chế *A. niger* hiệu quả với đường kính vòng kháng nấm đạt được từ 4,33 mm đến 27 mm và khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm đạt từ 7,22% đến 29,44% ở nồng độ tinh dầu 200 ppm. Tinh dầu trầm cho thấy hiệu quả ức chế thấp nhất so với hai loại tinh dầu còn lại. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, các chất nhũ hóa có vai trò quan trọng, giúp nâng cao hiệu quả kháng nấm của tinh dầu. Điều này cho thấy hiệu quả kháng nấm mốc phụ thuộc vào loại tinh dầu và chất nhũ hóa. Tween 80 cho thấy là chất nhũ hóa hiệu quả đối với ba loại tinh dầu trong khảo sát. Việc lựa chọn loại tinh dầu và chất nhũ hóa giúp tạo ra thành phần kháng nấm hiệu quả cho việc ứng dụng trong bảo quản nông sản theo hướng bền vững và an toàn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashok R, Ravindra S, Priyanka S, Bhanu P, Nawal KD (2011). Chemical composition of *Ocimum basilicum* L. essential oil and its efficacy as a preservative against fungal and aflatoxin contamination of dry fruits. *Int J Food Sci Technol* 46: 1840–1846
- Boubaker H, Karim H, El Hamdaoui. A, Msanda F, Leach D, Bombarda I, Vanloot P, Abbad A, Boudyach E H, Ait Ben Aoumar (2016). Chemical characterization and antifungal activities of four Thymus species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Ind Crop Prod* 86: 95–101.

- Combrinck S, Regnier T, and Kamatou GT (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33(2): p. 344-349.
- Dharini S, Silvia BB (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot* 64: 27-37.
- El-Baroty GS, Abd El-Baky HH, Farag RS, & Saleh MA (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African journal of biochemistry research*, 4(6), 167-174.
- Gorjian H, Mihankhah P and Khaligh NG (2022). Influence of tween nature and type on physicochemical properties and stability of spearmint essential oil (*Mentha spicata* L.) stabilized with basil seed mucilage nanoemulsion. *J Mol Liq* 359: p. 119379.
- Lieu MD, & Dang TKT (2021). Improvement of shelf-life of mangoes by chitosan coating enriched with cinnamon oil dissolved in Tween 80 combined with ethanol. *Food Bioscience*, 44, 101341.
- Morten Hyltdgaard, Tina Mygind and Rikke Louise Meyer., (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interaction with food matrix components. *Frontiers in microbiology* 3, 11-24.
- Muhammad I, Tahira R, Javed A, Jamal A, Raja MU, Munir A, & Ur-Rehman A (2017). Lemongrass essential oil as an alternate approach to manage seed associated fungi of wheat and rice. *Int J Agric Biol*, 19, 1301-1306.
- Sukatta U, Haruthaithanasan V, Chantarapanont W, Dilokkunanant U, & Suppakul P (2008). Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape in vitro. *Agriculture and Natural Resources*, 42(5), 169-174.
- Verica Aleksic, Petar Knezevic., (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169 240– 254.
- Zhang W, Mou Z, Wang Y, Chen Y, Yang E, Guo F, ... & Wang W (2019). Molybdenum disulfide nanosheets loaded with chitosan and silver nanoparticles effective antifungal activities: in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 486-497.

## EVALUATION OF THE *Aspergillus niger* INHIBITION ABILITY OF PEPPERMINT, BASIL, AND CAJUPUT ESSENTIAL OILS IN DIFFERENT EMULSIFIERS

Lieu My Dong<sup>1,3,4\*</sup>, Nguyen Thi Thanh Binh<sup>1</sup>, Phuong Thao Vy<sup>1</sup>, Nguyen Huu Hoa<sup>1</sup>, Huynh Ngoc Anh Thu<sup>1</sup>, Dang Thi Kim Thuy<sup>2</sup>, Nguyen Thuy Huong<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Plant Cell Technology, Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>4</sup>Vietnam National University Ho Chi Minh City (VNU-HCM), Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

This study aims to evaluate the effectiveness of peppermint, basil, and cajuput essential oils from Vietnam in inhibiting *Aspergillus niger*. The essential oil was diluted in Dimethylsulfoxide DMSO 1% (v/v) or Tween 80 1% (v/v) at different concentrations. Antifungal activity was evaluated using the agar plate diffusion method and mycelial growth inhibition (MGI%) value. The results show that the antifungal effect depends on the type of essential oil and emulsifier. In the emulsifier DMSO, the antifungal diameter was achieved from 4.33 to 18.66 mm, with the minimum inhibitory concentration achieved in all three essential oils being 50 µL/mL, while in the emulsifier Tween 80 is 6.66 to 27mm with the minimum inhibitory concentration in cajuput essential oil being 50 and 25 µL/mL in the other two essential oils. The ability to inhibit mycelial growth shows that emulsifiers significantly affect the inhibitory effect of the essential oils in the survey. Tween 80 was a good emulsifier for three essential oils, in which the inhibition of peppermint and basil essential oils at a concentration of 200 ppm reached 25% and 29.44%, respectively. With good emulsifying ability, Tween 80 shows potential for application in preserving agricultural products.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, emulsifier, antifungal, post-harvest, essential oil.

\* Author for correspondence: Tel: 0989961848; Email: donglm@huit.edu.vn or lmdong.sdh232@hcmut.edu.vn