

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA**

**LÝ THỊ MINH HIỀN**

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TẠO HỆ NHỮ TƯƠNG NANO TINH DẦU  
TIÊU ĐEN VÀ ỨNG DỤNG BẢO QUẢN THỰC PHẨM**

Ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số ngành: 62540101

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

**TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2021**

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: GS.TS. **Đổng Thị Anh Đào**

Người hướng dẫn 2:

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....  
.....

vào lúc          giờ          ngày          tháng          năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia Tp.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

### Tạp chí quốc tế

1. T. D. T. Vinh, L. T. M. Hien, D. T. A. Dao, “Formulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil nanoemulsion via phase inversion temperature method”, *Food Science and Nutrition*, vol.8, no.4, pp. 1741–1752, 2020, DOI: 10.1002/fsn3.1422
2. L. T. M. Hien, D. T. A. Dao, “Black pepper essential oil nanoemulsions formulation using EPI and PIT methods”, *Journal of Food Process and Preservation*, vol. 45, pp. e15216, 2021, DOI: 10.1111/jfpp.15216
3. L. T. M. Hien, T. D. Khoa, D. T. A. Dao, “Characterization of black pepper essential oil nanoemulsion fabricated by emulsion phase inversion method”, *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 46,e pp. 16207, 2022, DOI: 10.1111/jfpp.16207

## MỞ ĐẦU

Hiện nay, kỹ thuật nano được ứng dụng rất nhiều trong các lĩnh vực như hóa học, vật liệu, hóa dược, mỹ phẩm, thực phẩm,.... Kỹ thuật nano giúp tạo ra các vật liệu kích thước nanomet với nhiều đặc tính thuận lợi cho ứng dụng. Đối với dược phẩm và thực phẩm, kỹ thuật nano giúp phân tán, bảo quản tốt các thành phần có hoạt tính trong sản phẩm, giúp cơ thể hấp thu tốt hơn do kích thước phân tử nhỏ dễ thấm qua màng tế bào. Trong đó, hệ nhũ tương nano là một cấu trúc vật lý phù hợp để phân tán các hoạt chất khó hòa tan trong môi trường nước. Sự tạo thành hệ nhũ tương nano dầu trong nước nhằm bảo quản các hoạt chất của tinh dầu dễ bay hơi và oxy hoá bằng cách bao bọc các hợp chất này trong lớp bề mặt phân pha tạo thành từ các chất hoạt động bề mặt.

Các hợp chất trong tinh dầu thường khó hòa tan trong nước lại rất dễ bay hơi nên rất khó phân tán và giữ hoạt tính ổn định trong các ứng dụng. Hệ nano tinh dầu có khả năng phân tán, ổn định hoạt tính tinh dầu trong thực phẩm đồng thời có thể ngăn cản sự tách pha theo thời gian. Hệ nhũ tương nano tinh dầu trong nước được nghiên cứu nhằm tạo giải pháp ổn định động học của hệ trong môi trường có hàm lượng nước cao và giúp kéo dài hiệu quả hoạt động của tinh dầu trong thực phẩm.

Hạt tiêu đen là một loại gia vị phổ biến, tinh dầu từ hạt tiêu đen có giá trị sinh học cao, có thể ứng dụng trong thực phẩm với các vai trò như tạo hương vị, chống oxy hoá, kháng khuẩn,... nhưng chưa được sử dụng rộng rãi để tạo hương vị, bảo quản thực phẩm.

Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện đề tài: “NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TẠO HỆ NHỮ TƯƠNG NANO TINH DẦU TIÊU ĐEN VÀ ỨNG DỤNG BẢO QUẢN THỰC PHẨM”

Trong nghiên cứu này, tinh dầu tiêu đen được sử dụng làm hoạt chất trong hệ nhũ tương nano với kích thước hạt mong muốn bé hơn 100 nm. Chế phẩm nano nhũ tương từ tinh dầu tiêu đen được tạo thành bằng sự đảo pha với các phương pháp

năng lượng thấp, sử dụng chủ yếu năng lượng hóa học nội tại của hệ để tạo thành giọt có kích thước nano, giúp hệ nhũ tương nano tinh dầu phân tán tốt trong môi trường nước của thực phẩm, hạn chế sự bay hơi của tinh dầu đồng thời làm tăng hoạt tính kháng khuẩn. Phương pháp đảo pha được sử dụng có ưu điểm như ít tiêu tốn năng lượng, quy trình công nghệ đơn giản và thiết thực.

### **Mục tiêu tổng quát**

Xây dựng quy trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen có nguồn gốc từ Việt Nam để đa dạng hoá sản phẩm nano tinh dầu và sản phẩm từ tinh dầu tiêu đen nhằm áp dụng thiết thực trong việc đảm bảo chất lượng thực phẩm và nâng cao giá trị kinh tế cho nguồn nguyên liệu Việt Nam.

### **Nội dung nghiên cứu**

- Quá trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT – phase inversion temperature method): khảo sát quá trình tạo giọt nhũ tương do thay đổi nhiệt độ một cách đột ngột cùng với năng lượng cơ học gây nên sự nghịch đảo pha, tạo nên sự thay đổi hình thái và kích thước từ macro đến nano của giọt tinh dầu tiêu đen và chất nhũ hoá Tween 80, tạo hệ nhũ tương nano dầu trong nước.

- Quá trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI – emulsion phase inversion method): thành phần pha liên tục là tinh dầu có chứa chất nhũ hoá Tween 80 sẽ thay đổi khi nước được bổ sung chậm với tỷ lệ phù hợp dưới tác động của một lượng nhỏ năng lượng cơ học, hệ sẽ chuyển dần sang khác trạng thái khác nhau từ nhũ tương nước trong dầu sang trạng thái gel và cuối cùng là hệ nhũ tương nano dầu trong nước.

- Xác định khả năng kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp pha loãng nhằm xác định chỉ số nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) trên một số vi sinh vật thường gặp trong thực phẩm

- Ứng dụng nano tinh dầu tiêu đen trong quá trình bảo quản sản phẩm thịt

## **Ý nghĩa khoa học và thực tiễn**

- Ý nghĩa thực tiễn: xác định khả năng tạo thành nhũ tương nano tinh dầu từ nguồn tinh dầu của hạt tiêu đen Đaknông Việt Nam; sản phẩm nano tinh dầu tiêu đen là một sự đa dạng sản phẩm của tinh dầu tiêu, có thể được sử dụng phổ biến, đặc biệt là giá trị cảm quan và tính kháng khuẩn cho thực phẩm, cụ thể đối với thịt và sản phẩm chế biến từ thịt.

- Ý nghĩa khoa học: xác định được phương pháp và cơ chế tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu bằng phương pháp năng lượng thấp kết hợp sử dụng năng lượng nội tại của hệ để tạo thành giọt nhũ nano nhằm làm tăng khả năng phân tán và giảm thất thoát tinh dầu khi ứng dụng trong thực phẩm, đảm bảo hoạt tính của hệ nano tinh dầu tiêu.

## **Tính mới của đề tài**

Xác định nguồn tinh dầu tiêu của hạt tiêu đen Việt Nam phù hợp đối với công nghệ sản xuất hệ nhũ tương nano tinh dầu bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI), tạo nên sản phẩm giọt nhũ tương có kích thước nhỏ, 20 nm, ổn định tính chất trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, có đặc tính sinh học kháng các loại vi khuẩn *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* và vi sinh vật hiếu khí phát triển trên thịt và các sản phẩm từ thịt.

# CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1.1 Hệ nhũ tương nano

Thuật ngữ nhũ tương nano dùng để định nghĩa hệ nhũ tương có kích thước giọt nhũ tương đối nhỏ ( $< 200$  nm) so với hệ nhũ tương truyền thống ( $> 200$  nm). Hệ nhũ tương nano cũng có đặc tính không ổn định nhiệt động học như hệ nhũ tương macro nhưng sẽ ổn định động học hơn (kinetical stablization). Các thuật ngữ khác mô tả hệ nhũ tương nano như hệ nhũ tương mini, “hệ nhũ tương ultrafine”, hay hệ nhũ tương dưới micro “submicron emulsions”

Vì kích thước giọt nhỏ nên trọng lực tác động lên các giọt phân tán thường thấp. Từ đó hệ nhũ tương nano thường chậm bị tách pha hơn hệ nhũ tương truyền thống. Với sự cân bằng lực, hệ nhũ tương nano có thể bảo quản trong thời gian dài. Hệ nhũ tương nano phù hợp cho quá trình thẩm thấu nhanh các chất có hoạt tính (trong dược hay thực phẩm) vì kích thước giọt nhỏ và diện tích bề mặt tiếp xúc lớn của pha phân tán. Hệ nhũ tương nano thường được mô tả trong suốt hay trong mờ do không có hay ít sự tán xạ ánh sáng vì kích thước giọt nhỏ hơn bước sóng ánh sáng nhìn thấy được.

Thông thường để tạo thành hệ nhũ tương nano thường cần năng lượng lớn và nồng độ chất nhũ hóa cao hơn nhũ tương macro để giúp phân tán được giọt nhũ với đường kính nhỏ đồng nhất và ổn định hệ theo thời gian. Có hai nhóm phương pháp để tạo thành hệ nhũ nano: nhóm phương pháp năng lượng cao (áp suất cao, siêu âm cường độ cao, đồng hoá cơ tốc độ cao,...) và nhóm phương pháp năng lượng thấp (tạo nhũ ngẫu nhiên, chuyển pha do nhiệt độ, đảo pha do thay đổi tỷ lệ pha,...)

## 1.2 Tinh dầu tiêu đen và hoạt tính sinh học

Tiêu đen là một loại gia vị được dùng phổ biến trong thực phẩm ở nhiều quốc gia trên thế giới. Tiêu được trồng ở khu vực Nam Á và Đông Nam Á như Ấn Độ, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Campuchia,... Ngoài khu vực Châu Á các vùng có thể canh tác tiêu bao gồm Brazil, Mexico,...

Tiêu có tên khoa học là *Piper nigrum* L., là loại cây thân leo. Giá trị của tiêu đen tùy thuộc hàm lượng piperine và tinh dầu. Hàm lượng tinh dầu trong tiêu thường khoảng 2,0 – 7,0% trong khi hàm lượng piperine dao động từ 2,0 – 7,4%.

Thành phần tinh dầu tiêu bao gồm một số nhóm chất chính như sau: monoterpene và các dẫn xuất; sesquiterpene và các dẫn xuất và các hợp chất hàm lượng thấp khác.

Trong một số nghiên cứu gần đây, tinh dầu tiêu đen tự do hay trong hệ nhũ tương và hệ nhũ tương nano được minh chứng là có hoạt tính sinh học có thể ứng dụng trong thực phẩm và dược phẩm. Quan trọng là khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen đã thể hiện trên các loại vi sinh vật thực phẩm như *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Candida*, *Aspergillus*,....

Cơ chế kháng khuẩn của các hợp chất chính trong tinh dầu tiêu đen như  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, 3-carene, limonene và caryophyllene cũng ngày càng được quan tâm và nghiên cứu nhiều hơn.



## CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên vật liệu

Tinh dầu tiêu đen được mua từ nhà cung cấp Công ty An Phong, Daknong

Hóa chất: Tween 20, Tween 80, DMSO cung cấp bởi Bio Basic, Canada; Tween 40, Tween 60, DPPH, thuốc nhuộm Tetrazolium Chloride (TTC) cung cấp bởi Sigma-Aldrich.

Môi trường nuôi cấy vi sinh: Trypton Soy Agar (TSA), Trypton Soy Broth (TSB), Nutrient agar (NA), Nutrient Broth (NB), Endo agar (EA) và Xylose lysine deoxycholate agar (XLDA) cung cấp bởi HiMedia

Chủng vi sinh vật sử dụng gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25823.

Nguyên liệu thịt nạc đùi heo, thịt ức gà và thịt bò xay được dùng trong thí nghiệm được mua từ cửa hàng thịt VISSAN ngay trong ngày tiến hành thí nghiệm. Mẫu thịt mang về bảo quản trong điều kiện lạnh (5°C) không quá 2 giờ trước khi tiến hành các thí nghiệm.

### 2.2 Các quy trình tạo hệ nhũ tương nano

#### 2.2.1 Quy trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT)

Trong quá trình tạo hệ nhũ tương tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT – phase inversion temperature), một lượng tinh dầu tiêu đen xác định được trộn vào chất nhũ hóa với tỷ lệ phù hợp tạo thành hỗn hợp đồng nhất bằng cách khuấy từ ở tốc độ 800 vòng/phút trong 10 phút. Quá trình khuấy đảo thực hiện liên tục trong suốt quá trình tạo mẫu.

Sau đó, hệ nhũ tương macro dầu trong nước được tạo thành bằng cách cho từ từ hỗn hợp tinh dầu – chất nhũ hoá vào cốc chứa nước cất đã được định lượng sẵn, sao cho tổng lượng mẫu khoảng 40 – 100 mL trong một lần tạo mẫu. Trong quá trình tạo hệ nhũ tương macro, để tăng khả năng phân tán của pha dầu trong nước,

hỗn hợp được duy trì khuấy kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C. Hệ nhũ tương macro được tiếp tục gia nhiệt lên đến nhiệt độ 70 – 80°C với tốc độ gia nhiệt 2°C/phút. Khi hỗn hợp đạt đến nhiệt độ đảo pha (PIT), hỗn hợp giảm dần độ đục và trở nên trong suốt. Tiếp tục quá trình gia nhiệt để nhiệt độ hỗn hợp cao hơn nhiệt độ điểm đảo pha khoảng 3 - 5°C rồi mới tiến hành làm lạnh nhanh.

Hỗn hợp được làm lạnh nhanh đến 25°C bằng cách ngâm toàn bộ cốc chứa hỗn hợp vào bể nước lạnh ở nhiệt độ 5°C. Quá trình làm lạnh nhanh được thực hiện trên thiết bị khuấy từ, hỗn hợp được khuấy liên tục trong 30 phút để tăng hiệu quả quá trình trao đổi nhiệt và giúp hệ đồng nhất. Mẫu sau khi tạo thành được giữ ổn định trong 24 giờ trước khi tiến hành các phân tích cần thiết.

### **2.2.2 Quy trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)**

Phương pháp điểm đảo pha (Emulsion phase inversion– EPI) là một phương pháp tạo nhũ tương nano năng lượng thấp dựa trên sự đảo pha của hệ ở nhiệt độ cố định, thường là nhiệt độ phòng. Sự đảo pha này được thực hiện nhờ sự thay đổi tỷ lệ thành phần pha dầu và nước trong hệ nhũ.

Ở nghiên cứu này, quá trình tạo nhũ nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp điểm đảo pha được thực hiện qua các bước như sau. Chất nhũ hoá và tinh dầu tiêu đen được định lượng phù hợp (tùy thí nghiệm) và khuấy trộn trên thiết bị khuấy từ để tạo thành hỗn hợp đồng nhất. Tốc độ khuấy được duy trì ổn định ở 800 vòng/ phút nhằm mục đích phân tán đều các thành phần.

Nước cất được định lượng trước và thêm vào hỗn hợp chất nhũ hoá – tinh dầu bằng cách chuẩn độ với tốc độ ổn định từ 0,5 – 1,0 mL/ phút cho đến khi hết. Trong quá trình bổ sung nước cất, hệ thay đổi qua nhiều trạng thái tùy thuộc hàm lượng nước được thêm vào hệ ở giai đoạn đó. Khi hàm lượng nước đủ lớn, hệ hoàn toàn đồng nhất ở trạng thái nhũ tương nano D/N với đặc điểm không màu trong suốt hay hơi mờ đục.

Hỗn hợp tiếp tục được khuấy sau khi kết thúc quá trình chuẩn độ nước cho đến khi hệ đạt trạng thái đồng nhất, không còn tồn tại các mảng gel thì dừng lại. Hệ

nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen vừa hình thành được giữ ổn định trong thời gian 24 giờ ở các điều kiện khác nhau (tuỳ thí nghiệm) trước khi thực hiện các phân tích cần thiết.

## **2.3 Nội dung thí nghiệm**

### **2.3.1 Phần 1: Khảo sát quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha**

#### **2.3.1.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ gia nhiệt và tỷ lệ chất nhũ hoá – tinh dầu đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen**

Thí nghiệm 2 yếu tố, ngẫu nhiên hoàn toàn. Yếu tố: Nhiệt độ gia nhiệt 70 – 75 – 80 (°C) và Tỷ lệ chất nhũ hoá – tinh dầu (SOR) 2,25 – 2,50 – 2,75 (Bảng 2.2). Chỉ tiêu đánh giá: độ đục ( $\text{cm}^{-1}$ ) trong 1 tháng lưu mẫu. Kích thước giọt trung bình và chỉ số đa phân tán sau 1 tháng. Mẫu nano tối ưu trong Thí nghiệm 1 được phân tích GC – MS và đánh giá hình thái giọt bằng phương pháp TEM

#### **2.3.1.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng tinh dầu đến tính chất hệ nhũ tương nano bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT)**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: Hàm lượng tinh dầu 5,0 – 7,5 – 10,0 – 12,5 – 15,0 (% v/v) (Bảng 2.3). Chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước hạt (nm) và chỉ số đa phân tán.

### **2.3.2 Phần 2: Khảo sát quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)**

#### **2.3.2.1 Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng tinh dầu đến tính chất hệ nhũ tương nano tạo thành bằng phương pháp điểm đảo pha**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: Hàm lượng tinh dầu 5,0 – 7,5 – 10,0 – 12,5 – 15,0 (% v/v) (Bảng 2.4). Chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước hạt (nm) và chỉ số đa phân tán.

#### **2.3.2.2 Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ chuẩn độ nước đến tính chất hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen**

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: tốc độ chuẩn độ nước 0,5 – 0,7 – 1,0 (mL/ phút). Chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước hạt (nm) và chỉ số đa phân tán .

### 2.3.2.3 *Thí nghiệm 5: Khảo sát gián đồ pha các thành phần tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Trong thí nghiệm này, 0,5 mL tinh dầu được trộn đầu tiên với Tween 80 ở các thông số SOR khác nhau (1,0; 1,5; 2,0; và 2,5). Hỗn hợp được khuấy đồng nhất ở tốc độ 800 vòng/ phút trong 10 phút. Sau đó, nước cất được cho từ từ vào hỗn hợp với các hàm lượng tăng dần từ 0,5 mL đến tối đa 20 mL và xác định trạng thái của các mẫu với sự thay đổi hàm lượng nước. Trạng thái của các mẫu được quan sát sau khi tạo thành một giờ để ghi nhận trạng thái và thể hiện trên giản đồ pha.

### 2.3.3 *Phần 3: So sánh tính chất của hệ nhũ tương nano tạo thành bằng hai phương pháp đảo pha (PIT và EPI)*

#### 2.3.3.1 *Thí nghiệm 6: So sánh đặc điểm hoá học và hình thái vi cấu trúc của các mẫu nhũ tương nano*

Các mẫu nhũ tương PIT và EPI tạo thành với các thông số là kết quả của các thí nghiệm từ 1 đến 5. Mẫu được để ổn định 24 giờ ở nhiệt độ phòng và tiến hành đánh giá một số chỉ tiêu để hiểu rõ tính chất của từng hệ: Thành phần hoá học các hợp chất dễ bay hơi xác định bằng phương pháp GC – MS. Thành phần hoá học, đặc điểm các nhóm chức xác định bằng phương pháp phổ hồng ngoại FT – IR. Hình thái vi cấu trúc của hệ nhũ tương nano xác định bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).

#### 2.3.3.2 *Thí nghiệm 7: So sánh sự ổn định dưới tác động của nhiệt độ cao đến các mẫu nano tinh dầu tiêu đen*

Các hệ nhũ tương nano PIT và EPI sẽ được tăng và giảm nhiệt ba lần theo chu trình 30 – 100 – 30°C. Sau mỗi chu trình, mẫu được quan sát trạng thái và đo độ đục ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước giọt, chỉ số đa phân tán.

#### 2.3.3.3 *Thí nghiệm 8: So sánh sự ổn định theo thời gian của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen khi nhiệt độ bảo quản thay đổi*

Mẫu nhũ tương nano PIT và EPI sẽ được lưu ở 2 điều kiện nhiệt độ: 30°C và 5°C trong thời gian 28 ngày. Trong thời gian theo dõi mẫu được đánh giá chỉ tiêu độ đục ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước giọt nhũ (nm).

#### *2.3.3.4 Thí nghiệm 9: So sánh sự ổn định của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen dưới tác động của quá trình ly tâm*

Mẫu nhũ tương nano PIT và EPI được đem ly tâm ở các tốc độ 825xg; 1.467xg hay 2.292xg (tương ứng với tốc độ điều chỉnh trên thiết bị là 3.000; 4.000 và 5.000 vòng/ phút) trong thời gian 5 và 10 phút. Các mẫu sau ly tâm được đo độ đục ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước giọt (nm) và chỉ số đa phân tán để đánh giá biến đổi đặc điểm hoá lý.

#### *2.3.3.5 Thí nghiệm 10: So sánh hiệu quả mang tinh dầu của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen*

Mẫu nhũ tương nano PIT và EPI được xác định hiệu suất mang tinh dầu chứa trong mẫu ở các thời điểm 24 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi tạo thành bằng phương pháp chung cất lôi cuốn hơi nước.

### **2.3.4 Phần 4: Khảo sát quá trình hoàn thiện hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)**

#### *2.3.4.1 Thí nghiệm 11: Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện ổn định bằng quá trình lạnh đông – rã đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Mẫu nano tinh dầu EPI sẽ được giữ ổn định trong 24 giờ ở 2 điều kiện: 30°C và -15°C. Mẫu ổn định tại -15°C được rã đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng trước khi phân tích. Các chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu ( $\text{cm}^{-1}$ ), kích thước giọt (nm), chỉ số đa phân tán, đặc tính nhiệt bằng DSC – TGA, phân tích thành phần hoá học bằng GC – MS và xác định hoạt tính chống oxy hoá với thông số  $\text{IC}_{50}$  khi phản ứng với gốc tự do DPPH.

Sau đó, các mẫu được tiếp tục theo dõi sự thay đổi theo thời gian và đánh giá mức độ mất ổn định khi pha loãng với nước cất ở các tỷ lệ 1:10; 1:20; 1:30; 1:40 và 1:50 trong 3 giờ.

#### *2.3.4.2 Thí nghiệm 12: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lạnh đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: Nhiệt độ ổn định mẫu -15; -20; -25 °C (Bảng 2.7). Các chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu, kích thước giọt và chỉ số đa phân tán.

#### 2.3.4.3 *Thí nghiệm 13: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lạnh đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: Thời gian ổn định mẫu ở -15 (°C): 0 – 7 ngày (Bảng 2.8). Các chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu, kích thước giọt và chỉ số đa phân tán.

#### 2.3.4.4 *Thí nghiệm 14: Khảo sát ảnh hưởng các loại chất nhũ hoá Tween đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn một yếu tố: Loại chất nhũ hoá sử dụng Tween 20 – Tween 40 – Tween 60 – Tween 80 (Bảng 2.9). Chỉ tiêu đánh giá: độ đục mẫu, kích thước giọt và chỉ số đa phân tán. Ngoài ra, các mẫu gel tạo thành ở giai đoạn trung gian được đánh giá cảm quan và khảo sát hình thái vi cấu trúc với kỹ thuật SEM.

#### 2.3.4.5 *Thí nghiệm 15: Khảo sát một số tính chất của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen hoàn chỉnh trong thời gian lưu mẫu*

Trong 6 tháng lưu mẫu, mẫu được phân tích kích thước giọt mỗi tháng và đánh giá khả năng kháng oxy hoá ở thời điểm sau 3 tháng và sau 6 tháng. Ngoài ra, mẫu lưu sau 6 tháng được phân tích thành phần hoá học bằng phương pháp GC – MS.

### 2.3.5 ***Phần 5: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và ứng dụng hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trong quá trình bảo quản thịt***

#### 2.3.5.1 *Thí nghiệm 16: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp pha loãng*

Trong thí nghiệm này, 4 chủng vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* và *Staphylococcus aureus*) được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp pha loãng xác định MIC và MBC. Ngoài ra, mẫu tinh dầu tiêu đen tự do và kháng sinh amoxicillin được dùng như các mẫu đối chứng

*2.3.5.2 Thí nghiệm 17: Khảo sát hoạt tính ức chế vi khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trên thịt heo gây nhiễm*

Mẫu nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen được tiếp tục đánh giá hoạt tính kháng khuẩn trên thịt heo được gây nhiễm hai chủng vi khuẩn *E. coli* và *S. enterica*.

*2.3.5.3 Thí nghiệm 18: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen đến thịt heo – thịt gà bảo quản lạnh*

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn 1 yếu tố: Hàm lượng mẫu nano tinh dầu tiêu đen bổ sung 0; 1; 2 (% v/w) (Bảng 2.11). Thí nghiệm được tiến hành riêng trên 2 loại thịt: thịt gà, thịt heo

*2.3.5.4 Thí nghiệm 19: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đến sản phẩm thịt bò xay bảo quản lạnh*

Thí nghiệm một yếu tố được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn. Yếu tố: Hàm lượng mẫu nano tinh dầu tiêu đen 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 (%) (Bảng 2.12)

## CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

### 3.1 Thành phần hoá học của tinh dầu tiêu đen

Tổng 29 chất thành phần được tìm thấy trong mẫu tinh dầu tiêu đen nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu. Trong các hợp chất phát hiện được, có 5 chất chiếm hàm lượng cao tạo thành các đỉnh lớn trong sắc ký đồ tại các thời gian lưu (phút): 7,27; 9,10; 10,82; 11,82; và 29,08, cụ thể là các hợp chất  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, 3-carene, D-limonene và caryophyllene. Tổng hàm lượng 5 hợp chất trên chiếm đến 79,11% tổng mẫu tinh dầu.

Các hợp chất có hàm lượng thuộc nhóm trung bình (1-5%) gồm có các hợp chất:  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -phellandrene, p-cimene,  $\delta$ -elemene,  $\alpha$ -copaene, humulene,  $\delta$ -cadinene, caryophyllene oxide. Với tổng hàm lượng các chất ở nhóm này là 15,12%. Còn lại các hợp chất đều được tìm thấy với hàm lượng thấp (<1%).

### 3.2 Phần 1: Kết quả khảo sát quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha

#### 3.2.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ gia nhiệt và tỷ lệ chất nhũ hoá – tinh dầu đến hệ nhũ tương nano tinh dầu

Bảng 3.1 Kích thước giọt (nm) các hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha

Nhiệt độ (°C)	Kích thước giọt (nm)			P
	SOR 2,25	SOR 2,50	SOR 2,75	
70	14,3±12,5	29,3±8,4	15,6±10,9	0,2437
75	13,7±3,6	11,3±2,6	21,3±19,4	0,5699
80	21,6±13,6	15,3±4,3	17,4±14,4	0,8057

Bảng 3.2 Chỉ số đa phân tán của các hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha

Nhiệt độ (°C)	Chỉ số đa phân tán			P
	SOR 2,25	SOR 2,50	SOR 2,75	
70	1,700±1,482	0,755±0,035	0,963±0,453	0,4473
75	0,172 <sup>a</sup> ±0,070	1,066 <sup>b</sup> ±0,367	0,693 <sup>b</sup> ±0,248	0,0155
80	0,834 <sup>a</sup> ±0,325	0,297 <sup>a</sup> ±0,029	13,074 <sup>b</sup> ±3,979	0,0008



Hai nghiệm thức 75°C - SOR 2,25 và 80°C - SOR 2,50 cho hệ nhũ tương kích thước giọt nhỏ và đồng đều. Tuy nhiên để hạn chế tiêu thụ năng lượng, giảm sự mất hoạt tính do nhiệt, nghiệm thức 75°C - SOR 2,25 được sử dụng để tạo thành các mẫu thực hiện các mẫu tiếp theo và đánh giá tính chất của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen. Kết quả phân tích TEM cho thấy giọt nhũ có hình cầu, đồng nhất và phù hợp với kết quả đo đạc DLS. Tuy nhiên thành phần hoá học biến đổi nhiều khi phân tích GC – MS cho thấy cần khảo sát thêm để tạo hệ chất lượng tốt hơn. Ở thí nghiệm sau, thành phần tinh dầu được gia tăng và thời gian gia nhiệt được giảm thiểu nhằm tăng chất lượng mẫu nhũ tương.

### **3.2.2 *Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của hàm lượng tinh dầu đến tính chất hệ nhũ tương nano bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha***

Trong điều kiện thí nghiệm này với SOR 2,0, hai nghiệm thức tối ưu 10% và 12,5% tinh dầu tiêu đen đều cho thấy sự phù hợp để tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu với kích thước giọt lần lượt là 85,2 và 87,1 nm. Chỉ số đa phân tán ở cả hai mẫu đều bé hơn 0,5.

## **3.3 Phần 2: Kết quả khảo sát quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)**

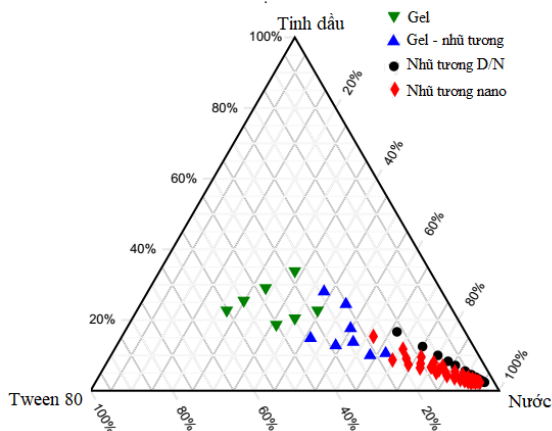
### **3.3.1 *Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của hàm lượng tinh dầu đến tính chất hệ nhũ tương nano tạo thành bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)***

Với mẫu 10% tinh dầu, có độ đục 4,05 cm<sup>-1</sup> và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mẫu còn lại trong thí nghiệm. Kích thước giọt nhũ trung bình là 32,1 nm và chỉ số đa phân tán 0,444, các số liệu này đều cho thấy mẫu 10% tinh dầu phù hợp để tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen với kích thước giọt nhỏ và độ đồng nhất cao.

### **3.3.2 *Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của tốc độ chuẩn độ nước đến tính chất hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen***

Kết quả thí nghiệm cho thấy giữa các nghiệm thức tốc độ chuẩn độ không có sự khác biệt có ý nghĩa về đặc điểm của hệ tạo thành. Tuy nhiên để tiết kiệm năng lượng và rút ngắn thời gian tạo thành mẫu, nghiệm thức tốc độ chuẩn độ nước 1,0 mL/phút được chọn lựa để làm thông số cho các thí nghiệm sau.

### 3.3.3 Thí nghiệm 5: Kết quả xây dựng giản đồ pha của các thành phần



Hình 3.1 Giản đồ pha tinh dầu – nước cất – Tween 80

Giản đồ pha cho thấy vùng nhũ tương nano nằm ở khu vực chứa hàm lượng nước cao > 60% và sẽ ổn định với thông số SOR 2,0 và 2,5. Tuy nhiên, để giảm thiểu hàm lượng chất nhũ hoá sử dụng, SOR 2,0 được chọn lựa để thực hiện các thí nghiệm sau.

### 3.4 Phần 3: Kết quả so sánh tính chất của hệ nhũ tương nano tạo thành bằng hai phương pháp đảo pha PIT và EPI

#### 3.4.1 Thí nghiệm 6: Kết quả so sánh đặc điểm hoá học và hình thái của hệ nhũ tương nano tạo thành bằng các phương pháp đảo pha

##### 3.4.1.1 Thành phần hoá học của các hệ nhũ tương tạo thành bằng phương pháp chuyển pha

Kết quả phân tích GC – MS cho thấy hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng hai phương pháp đảo pha vẫn bảo tồn được các hợp chất quan trọng chứa hàm lượng cao và đảm bảo hoạt tính sinh học của hệ. Tuy nhiên mẫu nhũ tương nano PIT mất đi một số chất có hàm lượng thấp có thể do thất thoát trong quá trình khuấy và gia nhiệt đồng thời khi tạo mẫu.

Với kết quả phân tích FT-IR cho thấy sự tồn tại của hầu hết các nhóm chức trong Tween 80 và tinh dầu tiêu đen trong các hệ nhũ tương nano tạo thành bằng phương pháp đảo pha (EPI và PIT). Ngoài ra, sự duy trì có mặt của các nhóm

chức cho thấy thành phần quan trọng của tinh dầu không mất đi trong quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano dù trong quá trình thực hiện có hay không có gia nhiệt. Như vậy sẽ đảm bảo hệ tạo thành duy trì được hoạt tính sinh học so với tinh dầu nguyên liệu.

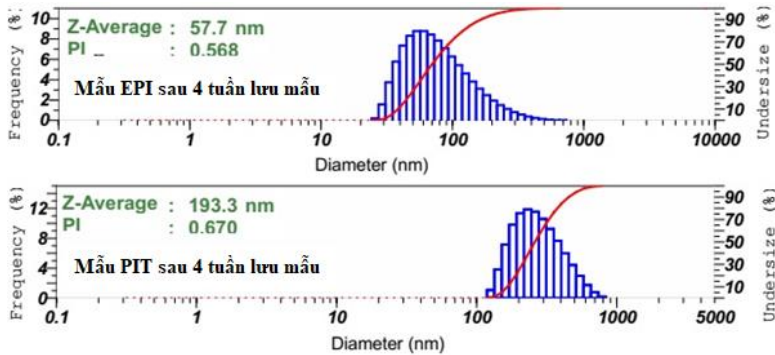
#### *3.4.1.2 Hình thái vi cấu trúc của các hệ nhũ tương nano tạo thành bằng phương pháp đảo pha*

Với mẫu nhũ tương nano PIT, hình thái cho thấy giọt nhũ không có cấu trúc hình cầu, có hình dạng hơi góc cạnh với kích thước không đồng nhất với kích thước giọt nhìn được dao động từ 100 nm đến 500 nm. Giọt nhũ tương nano EPI có cấu trúc hình cầu khá đồng đều với kích thước bé hơn 50 nm cho hầu hết các giọt. Theo kết quả hình thái vi cấu trúc giọt nhũ, hệ nhũ tương EPI phù hợp hơn để sử dụng và bảo quản trong thời gian dài.

#### *3.4.2 Thí nghiệm 7: Kết quả so sánh sự ổn định dưới tác động của nhiệt độ cao đến các mẫu nano tinh dầu tiêu đen*

Như vậy, cả hai mẫu nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng phương pháp đảo pha đều cho thấy sự ổn định sau một chu kỳ nâng và hạ nhiệt từ 100°C xuống nhiệt độ phòng. Các mẫu bắt đầu mất ổn định thể hiện qua sự thay đổi độ đục sau chu kỳ 2 và tăng các chỉ số kích thước giọt trung bình cùng với chỉ số đa phân tán rõ rệt sau chu kỳ gia nhiệt lần 3. Trong đó, mức độ mất ổn định bởi nhiệt sau 3 chu kỳ của mẫu EPI nhiều hơn so với mẫu PIT. Và sau 4 chu kỳ xử lý nhiệt cả hai mẫu đều hoàn toàn mất ổn định thể hiện qua sự tách pha.

#### *3.4.3 Thí nghiệm 8: Kết quả so sánh sự ổn định theo thời gian của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen khi nhiệt độ bảo quản thay đổi*



Hình 3.2 Sự phân bố kích thước giọt nhũ tương sau 4 tuần lưu mẫu ở 30°C

Kích thước giọt của mẫu PIT tăng cao (193,3 nm) với chỉ số đa phân tán 0,670. Trong khi mẫu EPI sau 4 tuần bảo quản ở nhiệt độ phòng kích thước giọt tăng đến 57,7 nm và chỉ số đa phân tán 0,568. Điều này cho thấy mẫu EPI vẫn đạt trạng thái ổn định của hệ nhũ tương nano sau 4 tuần.

#### 3.4.4 *Thí nghiệm 9: Kết quả so sánh sự ổn định của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen dưới tác động của quá trình ly tâm*

Cả hai hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành đều ổn định trong điều kiện ly tâm 3000 và 4000 vòng/phút trong thời gian 5 – 10 phút của thí nghiệm mà không nhận thấy sự tách pha.

#### 3.4.5 *Thí nghiệm 10: Kết quả khảo sát hiệu quả mang tinh dầu của các mẫu nano tinh dầu tiêu đen*

Hiệu suất mang tinh dầu của các mẫu xác định bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước tương ứng là khoảng 70-75% ở hệ nhũ tương EPI và 45-50% ở hệ nhũ tương PIT trong 4 tuần khảo sát.

### 3.5 Phần 4: Kết quả khảo sát quá trình hoàn thiện hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành bằng phương pháp điểm đảo pha (EPI)

#### 3.5.1 *Thí nghiệm 11: Ảnh hưởng của điều kiện ổn định bằng quá trình lạnh đông – rã đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen*

Các mẫu nano tinh dầu tiêu đen ổn định ở 30°C và -15°C cho thấy đồ thị nhiệt động học hoàn toàn khác biệt so với tinh dầu và Tween 80. Các đỉnh thu nhiệt

xuất hiện ở 131,14°C (mẫu đối chứng), trong khi đỉnh thu nhiệt của mẫu trải qua lạnh đông – rã đông là 113,10°C. Các nhiệt độ này thể hiện sự bay hơi của nước và được minh chứng trong đồ thị TGA với sự giảm khối lượng sau các đỉnh thu nhiệt tương ứng là 59,55% và 71,39%. Sự tăng nhiệt độ sôi của nước cao hơn 100°C cho thấy có sự phân tán tốt pha dầu trong hệ.

Trong thời gian lưu mẫu 6 tuần, mẫu đối chứng - mẫu ổn định nhiệt độ phòng bắt đầu tách pha quan sát ở tuần thứ 5 và thể hiện thành hệ mất ổn định với chỉ số đa phân tán rất cao ở tuần 6 (PDI = 3,088). Trong khi đó mẫu trải qua quá trình lạnh đông - rã đông vẫn duy trì trạng thái ổn định ( $Z < 20$  nm và  $PDI < 0,7$ ) sau cùng thời gian 6 tuần.

Hai mẫu được phân tích GC – MS sau 1 tháng lưu mẫu. Kết quả cho thấy các hợp chất quan trọng vẫn duy trì với hàm lượng cao. Tuy nhiên sự gia tăng nhiều hơn các dẫn xuất của caryophyllene trong mẫu đối chứng cho thấy mẫu trải qua lạnh đông ổn định hơn về bản chất hoá học.

Khả năng kháng oxy hoá của tinh dầu tự do và 2 mẫu nano trong thí nghiệm này cho thấy hoạt tính kháng không cao. Tuy nhiên mẫu nano trải qua lạnh đông do bảo tồn thành phần hoá học tốt hơn nên hoạt tính cao hơn tinh dầu và mẫu đối chứng với  $IC_{50} = 18,99$  mg/mL so với 20,84 và 20,98 mg/mL.

Ngoài ra, sự ổn định của mẫu nano tinh dầu trải qua đông lạnh – rã đông cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy trong 3 giờ sau pha loãng, chỉ các tỷ lệ pha loãng với hàm lượng nước cao (1:40 và 1:50) có sự gia tăng PDI, mẫu dần mất sự đồng nhất, tuy nhiên kích thước giọt trung bình vẫn bé hơn 20 nm.

### ***3.5.2 Thí nghiệm 12: Ảnh hưởng của nhiệt độ lạnh đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen***

Kết quả phân tích số liệu cho thấy không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức nhiệt độ đông lạnh khác nhau. Trong đó, kích thước giọt nhũ tương đều dưới 20 nm và chỉ số đa phân tán dao động từ 0,2 đến dưới 0,6. Tuy nhiên, để tiết kiệm năng lượng sử dụng, nhiệt độ -15°C được chọn lựa cho quá trình xử lý mẫu và ứng dụng thành thông số quá trình ở các thí nghiệm sau.

### **3.5.3 *Thí nghiệm 13: Ảnh hưởng của thời gian lạnh đông đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen***

Kết quả phân tích cho thấy, thời gian lạnh đông không ảnh hưởng độ đục và kích thước mẫu, tuy nhiên tạo sự khác biệt ở chỉ số đa phân tán. Trong đó chỉ số đa phân tán của các mẫu đông lạnh ở từ 1 đến 4 ngày có giá trị thấp từ bé hơn 0,2. Thời gian đông lạnh kéo dài làm thay đổi chỉ số đa phân tán. Như vậy, thời gian đông lạnh hiệu quả để ổn định hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen ở  $-15^{\circ}\text{C}$  là 1 ngày, vừa đảm bảo tính chất ổn định vừa tiết kiệm năng lượng sử dụng trong quá trình làm lạnh.

### **3.5.4 *Thí nghiệm 14: Ảnh hưởng các loại chất nhũ hoá không ion đến hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen***

Kết hợp quan sát sự khác biệt về trạng thái gel và trạng thái nhũ tương tạo thành cùng với kết quả đo đặc kích thước giọt, Tween 60 và Tween 80 cho hệ nano có kích thước giọt bé (24,60 nm và 19,57 nm) và chỉ số đa phân tán thấp. Ngoài ra, Tween 80 còn tạo thành hệ với chất lượng ổn định hơn khi độ lệch chuẩn của kích thước giọt giữa các lần lặp lại thấp ( $SD=0,85$ ). Do đó, Tween 80 là chất hoạt động bề mặt phù hợp nhất để tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trong điều kiện thí nghiệm của đề tài này.

### **3.5.5 *Thí nghiệm 15: Kết quả khảo sát hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen hoàn chỉnh trong thời gian lưu mẫu***

Số liệu kích thước giọt nhũ ở các mẫu nano tinh dầu tiêu trong thời gian 6 tháng theo thời gian không có sự thay đổi đáng kể ( $< 20$  nm). Tuy nhiên, chỉ số đa phân tán có khác biệt và tăng từ 0,087 đến 0,608. Chỉ số này vẫn bé hơn 0,7, nên hệ vẫn được đánh giá là ổn định sau 6 tháng.

Sau 6 tháng lưu mẫu, thành phần hoá học có sự biến đổi nhẹ tuy nhiên các thành phần quan trọng vẫn chiếm hàm lượng cao với sự tạo thành ghi nhận được của 2 dẫn xuất từ caryophyllene là caryophyllene oxide (5%) và caryophylladienol II (0,15%).

Chỉ số IC<sub>50</sub> thể hiện hoạt tính kháng oxy hoá tăng lên theo thời gian cho thấy sự giảm hoạt tính này của hệ. Cụ thể là tăng từ 18,99 mg/mL tăng lên 22,25 mg/mL (sau 3 tháng) và 28,77 mg/mL (sau 6 tháng).

### **3.6 Phần 5: Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và ứng dụng hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trong quá trình bảo quản thịt**

#### **3.6.1 Thí nghiệm 16: Hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen đánh giá bằng phương pháp pha loãng**

Với chỉ số MIC và MBC thu được, mẫu nhũ tương nano tinh dầu thể hiện hoạt tính kháng tốt hơn so với tinh dầu tự do ở cả 4 loại vi khuẩn khảo sát. Trong đó, khả năng kháng tốt nhất của nano tinh dầu tiêu đen là đối với *E. coli* và *S. enterica*, sau đó đến *P. aeruginosa*, và ức chế kém nhất với *S. aureus*. Ngoài ra, mẫu đối chứng dương amoxicillin cũng thể hiện hoạt tính tốt tương đương mẫu nano trên *E. coli* và *S. enterica*.

#### **3.6.2 Thí nghiệm 17: Hoạt tính ức chế vi khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trên thịt heo gây nhiễm**

Dựa trên số lượng khuẩn lạc xác định được, mẫu thịt heo nhúng trong dung dịch nano có khả năng hạn chế sự phát triển của *E. coli* gây nhiễm trong 4 ngày bảo quản lạnh so với mẫu đối chứng không nhúng. Tương tự phương pháp thực hiện, dung dịch nano tinh dầu cho thấy hiệu quả ức chế *S. enterica* gây nhiễm trên thịt heo tốt hơn có khác biệt trong suốt 6 ngày bảo quản lạnh so với mẫu đối chứng.

#### **3.6.3 Thí nghiệm 18: Ảnh hưởng của hàm lượng nano tinh dầu tiêu đen đến thịt ướp gia vị bảo quản lạnh**

Với mẫu thịt gà, khi hàm lượng nano bổ sung trong mẫu thịt gà tăng từ 1% đến 2% thì mật độ vi sinh vật hiếu khí cũng giảm có ý nghĩa thống kê. Và sau 6 ngày bảo quản, mật độ vi sinh vật hiếu khí của các mẫu thịt gà có bổ sung nano tinh dầu tiêu đen có mật độ bé hơn 5 Log CFU/g nghĩa là bé hơn 10<sup>5</sup> CFU/g, trong khi mẫu thịt ướp gia vị đối chứng mật độ vi sinh vật tăng nhanh và vượt 5 Log CFU/g ngay ở ngày thứ 2 bảo quản.

Với mẫu thịt heo không ướp nano tinh dầu tiêu đen, có sự gia tăng mật độ vi sinh vật hiếu khí nhanh nhất đạt 5,1 Log CFU/g từ ngày thứ 2 và tiếp tục tăng đến

5,17 Log CFU/g ở ngày thứ 6. Với các mẫu chứa nano tinh dầu, tốc độ tăng mật độ vi sinh vật chậm hơn, sau 6 ngày mật độ vẫn bé hơn 5,0 Log CFU/g. So sánh các nghiệm thức chứa nano tinh dầu, có sự khác biệt mật độ vi sinh vật ở ngày 2 giữa hai hàm lượng nano tinh dầu. Tuy nhiên, ở ngày 4 và 6 không có sự khác biệt mật độ vi sinh vật hiệu khí khi bổ sung 1% hay 2% nano tinh dầu trong thịt heo.

Như vậy, khi bổ sung nano tinh dầu tiêu đen trực tiếp vào thịt heo – thịt gà ở hàm lượng khảo sát có hiệu quả ức chế sự phát triển vi sinh vật hiếu khí so với mẫu đối chứng trong suốt 6 ngày bảo quản lạnh. Khi so sánh mức độ nhiễm vi sinh vật hiếu khí với tiêu chuẩn thịt tươi và thịt bảo quản mát (TCVN 7046-2009; TCVN 1212429-1:2018; TCVN 12429-3:2021) thì sau 6 ngày bảo quản, thịt heo và gà trong thí nghiệm có chứa nano tinh dầu tiêu đen đều có mật độ đạt yêu cầu ( $< 10^5$  CFU/g).

### ***3.6.4 Thí nghiệm 19: Ảnh hưởng của hàm lượng nano tinh dầu tiêu đen đến sản phẩm thịt bò xay***

Trong thí nghiệm này, sự gia tăng hàm lượng nano tinh dầu bổ sung không chỉ làm giảm mật độ vi sinh vật hiếu khí mà còn ổn định pH thịt so với mẫu đối chứng. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức thể hiện ở cả 3 thời điểm đánh giá với giá trị  $P < 0,05$ . Mật độ vi sinh vật hiếu khí trong mẫu đối chứng tăng nhanh từ 6,22 lên 9,33 LogCFU/g từ ngày 2 đến ngày 6 trong thời gian bảo quản. Với các nồng độ nano nhũ tương bổ sung 2% và 5%, mật độ vi sinh vật được ức chế tốt hơn, ở 6 ngày chỉ tăng đến 7,3 và 6,2 LogCFU/g. Ngoài ra, do kiểm soát được vi sinh vật nên sự biến đổi các thành phần hoá học ở các mẫu này cũng được giảm thiểu và chỉ số pH của mẫu thịt duy trì ở mức 5,3 và 5,4 không giảm thấp xuống đến 4,9 như mẫu đối chứng.

Ngoài ra, khi so sánh với TCVN 7046-2009 cho thịt tươi xay, mẫu thịt đạt chất lượng khi mật độ vi sinh vật hiếu khí bé hơn 6 Log CFU/g và không thấp hơn pH 5,5 thì trong điều kiện bảo quản của thí nghiệm, các nghiệm thức chứa 2% nano tinh dầu bảo quản thịt được 2 ngày và nghiệm thức 5% nano tinh dầu bảo quản thịt đạt chất lượng trong vòng 4 ngày.



## CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ

### 4.1 Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được phương pháp điểm đảo pha (EPI) là phương pháp phù hợp cho quá trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen. Đây là một phương pháp năng lượng thấp, giúp tiết kiệm năng lượng trong quá trình tạo thành đồng thời đảm bảo được sự ổn định của hệ nhũ tương nano và thành phần hoạt chất của tinh dầu trong suốt thời gian lưu mẫu 6 tháng.

Các thông số hàm lượng thành phần phù hợp của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen bao gồm: 10% tinh dầu tiêu đen, 20% chất nhũ hoá Tween 80 và 70% pha nước. Các thông số khác của quá trình giúp đảm bảo hiệu quả tạo nhũ tương nano như lưu lượng nước bổ sung vào pha phân tán thích hợp là 1 mL/phút kết hợp tốc độ khuấy 800 vòng/ phút. Ngoài ra, quá trình lạnh đông mẫu nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen ở -15°C trong 24 giờ sau đó rã đông ở nhiệt độ phòng cho thấy có hiệu quả làm tăng độ ổn định hoá lý của mẫu thể hiện qua việc làm giảm kích thước giọt nhũ xuống bé hơn 20 nm và giảm chỉ số đa phân tán xuống thấp hơn 0,1.

Mặt khác, nghiên cứu còn cho thấy phương pháp điểm đảo pha (EPI) cho hiệu quả tạo nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tốt hơn phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT) ở các tiêu chí như ổn định tính chất hoá lý, đảm bảo hình thái dạng cầu đồng đều của các giọt phân tán và bảo tồn tốt hơn tinh dầu tiêu đen và các hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu tiêu đen.

Với tính chất hoá lý ổn định, hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen đã mở ra được tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen cũng được kiểm chứng trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, hệ có khả năng ức chế tốt hai loại vi khuẩn gây ngộ độc thịt là *Escherichia coli* và *Salmonella enterica* trên cả môi trường tổng hợp trong thí

nghiệm pha loãng nồng độ xác định MIC và MBC và trên môi trường thịt heo với thí nghiệm gây nhiễm vi khuẩn rồi xác định khả năng ức chế của mẫu nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen.

Sau đó, hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen được sử dụng như chất bảo quản bổ sung vào thịt tươi (heo, gà, bò xay) và kết quả thể hiện rất khả quan. Cụ thể là tất cả các mẫu thịt có bổ sung nano tinh dầu tiêu đen sau từ 4 đến 6 ngày bảo quản lạnh đều có chỉ tiêu vi sinh vật hiếu khí thấp hơn so với mẫu đối chứng trong cùng thí nghiệm và đạt các tiêu chuẩn cho sản phẩm thịt theo TCVN 7046:2009 (cho thịt tươi) và TCVN 12429-1:2018 (cho thịt heo mát) và TCVN 12429-3:2021 (cho thịt gia cầm mát).

Hơn nữa, hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen còn thể hiện khả năng chống oxy hoá với giá trị  $IC_{50}$  là 18,99 mg/mL khi xác định bằng phương pháp ức chế gốc tự do DPPH.

Như vậy, hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen tạo thành vừa có sự ổn định cao, vừa có khả năng thể hiện tốt hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen trên sản phẩm thực phẩm. Từ đó tạo được tiềm lực phát triển ứng dụng thực tiễn và nâng cao giá trị sử dụng cho tinh dầu từ nguồn nông sản tiêu đen của Việt Nam.

## **4.2 Kiến nghị**

Để tiếp tục hoàn thiện và mở rộng nghiên cứu, có thể khảo sát thêm một số nội dung như sau:

- Nghiên cứu khả năng ứng dụng hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trên các nhóm sản phẩm rau củ và sốt

- Nghiên cứu tính kháng nấm và các loại vi khuẩn của hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen trên các thực phẩm khác để có những minh chứng rõ hơn về hoạt tính sinh học và có thể mở rộng ứng dụng đối với nhiều dạng thực phẩm khác.