

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

PHẠM THỊ LAN CHI

**THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH ĐẶC TRƯNG, TÁC  
ĐỘNG LÊN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ TRÍCH LY  
TINH DẦU VỎ VÀ LÁ *CITRUS***

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm  
Mã số chuyên ngành: 62 54 01 01

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: PGS.TS Phạm Văn Hùng

Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Phi

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 SCI-E

1. **Chi, P.T.L.**, Hung, P.V., Thanh, L.H., Phi, N.T.L., “Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils”, *Water and Biomass Valorization*, vol. 4, 2019. **SCI-E, IF = 2.851.**
2. Phi, N.T.L, Hung, P.V., **Chi, P.T.L.**, Dung, N.H., “Impact of extraction methods on antioxidant and antimicrobial activities of Citrus essential oils”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol.18, pp. 806-817, 2015. **SCI-E, IF = 0.854.**
3. Phi, N.T.L, Hung, P.V., **Chi, P.T.L.**, Tuan, P.D, “Impact of growth locations and genotypes on antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils in Vietnam”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol.18, pp.1421-1432, 2015. **SCI-E, IF = 0.854.**

### Tạp chí non-SCI

1. **Chi, P.T.L.**, Chinh, V.K., Hung, P.V., Phi, N.T.L., “Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from leaves of Vinh orange, Dao lime and Thanh Tra pomelo in Vietnam”, *International Journal of Food Science and Nutrition*, vol.3, pp. 152-156, 2018.

### Tạp chí trong nước

1. **Chi, P.T.L.**, Tuyen, V.T.T., Phi, N.T.L., “Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of different kinds of citrus leaves”, *Journal of Biotechnology*, vol.14, pp. 337-342, 2016.

### Kỷ yếu hội nghị quốc tế

1. Phi, N.T.L, **Chi, P.T.L.**, Sawamura, M., “Chemical compositions and antioxidant of essential oils of citrus in Vietnam”, In *Proceedings of FOOMA Japan 2017*, pp.177-180, 2017.
2. **Chi, P.T.L.**, Thanh, L.H., Chinh, V.K., Hung, P.V., Phi, N.T.L., “Chemical compositions and antimicrobial of leaf essential oils of different citrus varieties”, In *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on sustainable Agriculture and Agro-Industry (ISSAA)*, pp.63, 2017.
3. Giau, N.T.P., **Chi, P.T.L.**, Phi, N.T.L., “Enzyme-assisted vacuum distillation essential oils from Vietnamese citrus leaves, their chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, In *Proceeding of*

*International VBFoodNet2017 Conference on Safety and Quality in the Food Chain, 2017.*

4. Thanh, L.H., **Chi, P.T.L.**, Phi, N.T.L., “Chemical composition, Antioxidant and Antibacterial activities of Citrus Limonia Osbeck”, In *Proceeding of International VBFoodNet2017 Conference on Safety and Quality in the Food Chain, 2017.*
5. **Chi, P.T.L.**, Hung, P.V., Phi, N.T.L., “Optimization of extraction condition of essential oil from peel of *Citrus limonia Osbeck* by response surface method”, In *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International conference on sustainable global agriculture and food*, pp.311-342, 2018.

## A. PHẦN MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Hiện nay, các chất tổng hợp có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa được sử dụng rộng rãi trong việc bảo quản thực phẩm. Tuy nhiên, trong hơn hai thập kỷ qua, tác dụng phụ của các chất tổng hợp này đến sức khỏe của con người được dư luận rất quan tâm. Vì vậy, các nghiên cứu gần đây tập trung vào các hợp chất an toàn có nguồn gốc tự nhiên có thể thay thế các chất tổng hợp trong bảo quản thực phẩm. Với khả năng chống oxy hóa và kháng vi khuẩn, tinh dầu trích ly từ vỏ và lá *Citrus* có thể được dùng trong bảo quản thực phẩm và tránh các vấn đề liên quan đến sức khỏe. *Citrus* là loại quả có múi, thuộc họ *Rutaceae*, có nguồn gốc và được trồng rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới phía nam của châu Á.

Tinh dầu trích ly từ *Citrus* được công nhận là an toàn và mang lại rất nhiều lợi ích, nhiều nghiên cứu về phương pháp trích ly, thành phần hóa học và hoạt tính của tinh dầu *Citrus* đã được thực hiện ở Việt Nam và trên khắp thế giới. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chưa đi sâu nghiên cứu đánh giá tác động lên các chủng vi khuẩn và chưa đánh giá có hệ thống trên nhiều loại cây chi *Citrus* trong cùng một nghiên cứu. Ngoài ra, các tác nhân tạo ra hoạt tính kháng khuẩn ở tinh dầu *Citrus* vẫn chưa được nghiên cứu. Hơn nữa, các phương pháp trích ly tinh dầu *Citrus* thông thường có những nhược điểm ảnh hưởng đến hiệu suất và chất lượng của tinh dầu *Citrus*.

### 2. Mục tiêu của luận án

- Nghiên cứu chi tiết thành phần hóa học, các hoạt tính đặc trưng, các phương thức tác động lên vi khuẩn và đánh giá tác nhân tạo nên hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu *Citrus* ở Việt Nam và tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất để hạn chế ảnh hưởng đến chất lượng tinh dầu đồng thời tăng hàm lượng tinh dầu trích ly được.

### 3. Đóng góp mới của luận án

- Phương thức tác động của tinh dầu *Citrus* lên vi khuẩn được xác định.
- Phương thức tác động của từng thành phần chính và sự kết hợp của các thành phần đó lên vi khuẩn được xác định rõ giúp dự đoán vai trò của các thành phần đối với hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu.
- Phương pháp trích ly được cải tiến để tăng lượng tinh dầu trích ly được và hạn chế tối thiểu những thay đổi về chất lượng của tinh dầu.

## B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

### PHẦN 1: TỔNG QUAN

Tổng quan về nguồn gốc và sự đa dạng của quả *Citrus*; sản lượng *Citrus*; tinh dầu *Citrus*, phương pháp tách chiết, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu *Citrus* và tác động của tinh dầu lên vi khuẩn được trình bày trong luận án.

### PHẦN 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Nguyên liệu

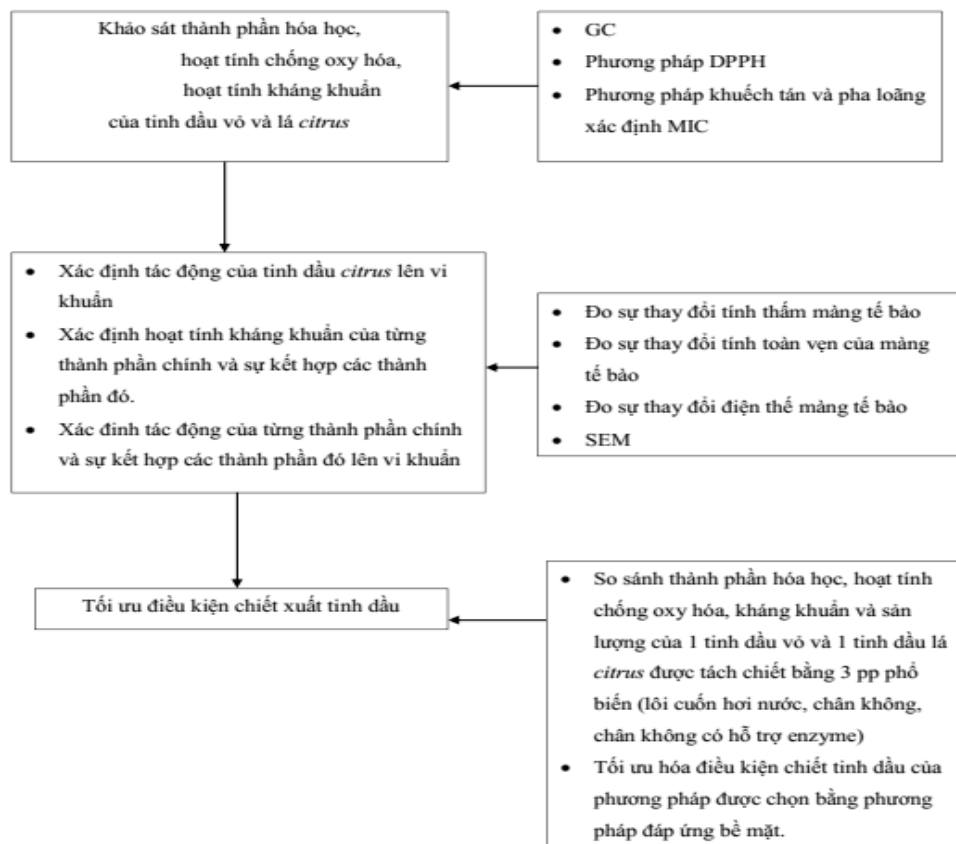
Bảng 2.1 Mẫu vỏ *Citrus*

Mẫu	Ký hiệu	Tên khoa học
Cam Xoàn	CX	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck
Cam Vinh	CV	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck
Cam Phú Thọ	CPT	<i>Citrus</i> hybrid - <i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus maxima</i>
Bưởi Tân Triều	BTTTr	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Bưởi Thanh Trà	BThT	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Bưởi Đoan Hùng	BĐH	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Chanh Long An	CLA	<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle
Chanh Đà Lạt	CĐL	<i>Citrus limonia</i> Osbeck
Chanh Đào	CĐ	<i>Citrus</i> hybrid – <i>Citrus spp.</i>

Bảng 2.2 Mẫu lá *Citrus*

Mẫu	Ký hiệu	Tên khoa học
Cam Xoàn	CX	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck
Cam Vinh	CV	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck
Bưởi Tân Triều	BTr	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Bưởi Thanh Trà	BThT	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Bưởi Đoan Hùng	BĐH	<i>Citrus grandis</i> Osbeck
Chanh Long An	CLA	<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle
Chanh Đà Lạt	CĐL	<i>Citrus limonia</i> Osbeck
Chanh Đào	CĐ	<i>Citrus</i> hybrid – <i>Citrus</i> spp.

## 2.2 Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1 Sơ đồ nghiên cứu

## **2.3. Phương pháp**

### **2.3.1. Trích ly tinh dầu**

#### *2.3.1.1. Phương pháp ép lạnh*

Tinh dầu được ép lớp vỏ và thu lại bằng dung dịch nước muối 40%, được giữ lạnh. Dịch chiết được ly tâm ở 4000g trong 15 phút. Tinh dầu vỏ *Citrus* được khử nước bằng natri sulfat khan ở 4°C. Hiệu suất trích ly được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng tinh dầu (\%)} = \frac{\text{khối lượng tinh dầu thu hồi}}{\text{khối lượng quả hoặc lá tươi}} \times 100$$

#### *2.3.1.2. Phương pháp lôi cuốn hơi nước*

200g nguyên liệu nghiền được thêm nước cất và chung cất trong 3 giờ. Sau khi trích ly, tinh dầu được tách nước và được khử nước bằng natri sulfat khan ở 4°C.

#### *2.3.1.3. Phương pháp chưng cất chân không*

200g nguyên liệu nghiền được thêm nước cất và chung cất chân không trong 3 giờ. Áp suất của hệ thống duy trì ở 575 mm Hg. Tinh dầu thu nhận được khử nước bằng natri sulfat khan và được bảo quản ở 4°C.

#### *2.3.1.4. Phương pháp chưng cất chân không có hỗ trợ enzyme*

Trước khi trích ly, vỏ và lá *Citrus* được ngâm với nước cất trong 45°C, pH đạt 4.5. Sau đó, pectinase được thêm vào mẫu chứa vỏ *Citrus*. Viscozyme-L được thêm vào mẫu chứa lá *Citrus*. Tiếp theo, mẫu được chưng cất chân không ở áp suất 575mm Hg trong 3 giờ. Tinh dầu thu nhận được khử nước bằng natri sulfat khan và được bảo quản ở 4°C.

### **2.3.2. Phân tích thành phần tinh dầu *Citrus***

Việc phân tích tinh dầu được thực hiện bởi thiết bị GC-MS Agilent 7890A-MS và cột DB - 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)



### **2.3.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa**

Hỗn hợp tinh dầu, methanol và DPPH được ủ trong 15 phút trong tối, sau đó được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm.

### **2.3.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn**

#### **2.3.4.1. Phương pháp khuếch tán**

Dịch nuôi vi khuẩn ( $10^6$ cfu/mL) được trải đều trên môi trường thạch TSA. Đĩa thạch được để khô 15 phút trước khi đục lỗ (đường kính 9mm). Tinh dầu *Citrus* được nhỏ vào lỗ, mỗi tinh dầu được lặp lại 3 lần. Các đĩa thạch được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo đơn vị mm.

#### **2.3.4.2. Phương pháp pha loãng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu**

Tinh dầu *Citrus* được pha loãng thành các nồng độ khác nhau. Sau đó, tinh dầu được thêm vào dịch nuôi vi khuẩn ( $10^6$ cfu/mL) trong môi trường lỏng TSB. Các ống nghiệm được ủ trong 24 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, ở mỗi nồng độ tinh dầu, lấy 100µl trải trên môi trường thạch TSA và ủ trong 24 giờ để xác định MIC.

### **2.3.5. Xác định tác động của tinh dầu lên vi khuẩn**

#### **2.3.5.1. Sự thay đổi tính thấm màng tế bào**

Sự thay đổi của tính thấm của màng tế bào vi khuẩn được thể hiện qua sự thay đổi độ dẫn điện tương đối. Dung dịch *S. aureus* được ly tâm trong 10 phút ở 1500g. Tế bào *S.aureus* được rửa bằng dung dịch glucose 5% cho đến khi độ dẫn điện gần với độ dẫn điện của glucose 5%. Độ dẫn điện được đo bằng máy Extech EC400 (Taiwan). Các tế bào này được coi là tế bào vi khuẩn đẳng trương. Dung dịch glucose 5% được thêm vào tinh dầu *Citrus* ở nồng độ 21 mg/mL và đo độ dẫn điện, được ký hiệu là L1. Tinh dầu *Citrus* ở 21 mg/mL được thêm vào dung dịch vi khuẩn đẳng trương, được ủ ở 37°C trong 8 giờ. Độ dẫn điện được đo hai giờ một lần và được ký hiệu là L2. Độ dẫn điện của vi khuẩn trong dung dịch glucose 5% được đun sôi trong 5 phút được sử dụng làm đối chứng và được ký hiệu là L0. Tính thấm của màng tế bào được tính theo công thức:

$$\text{Độ dẫn điện tương đối (\%)} = 100 \times \frac{L2-L1}{L0} \quad (2.1)$$

#### 2.3.5.2. Sự thay đổi tính toàn vẹn của màng tế bào

Tính toàn vẹn của màng tế bào được đánh giá bằng cách đo sự giải phóng các thành phần tế bào bao gồm axit nucleic vào dịch tế bào. Dung dịch *S. aureus* được ly tâm trong 15 phút ở 3000g. Tế bào được rửa bằng PBS (0.1 M, pH 7.4). Tinh dầu *Citrus* ở nồng độ 21 mg/mL được thêm 100 mL dịch vi khuẩn đã rửa sạch được lắ và ủ ở 37°C trong 5 giờ. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở 6000g trong 5 phút. Phần dung dịch nổi được thu nhận, pha loãng với PBS, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm. Các mẫu được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 260 nm.

#### 2.3.5.3. Sự thay đổi điện thế màng tế bào

Tinh dầu *Citrus* ở nồng độ 21mg/mL được thêm vào dung dịch chứa *S. aureus* ( $10^6$  cfu/mL) và ủ trong 5 giờ. Rhodamine 123 được pha với PBS để thu được dung dịch gốc 1 mg / mL. Mẫu chứa tinh dầu và vi khuẩn được rửa hai lần bằng PBS và sau đó Rhodamine123 được thêm vào để đạt được nồng độ cuối cùng là 2µg/mL. Sau khi để trong bóng tối 30 phút, các mẫu được rửa sạch hoàn toàn và rửa lại trong PBS. Mẫu được đo bằng máy đo phổ huỳnh quang (Synergy HT, USA). Mẫu được kích thích ở 480 nm và phát xạ thu được ở 530 nm. Dữ liệu thu nhận được biểu thị bằng cường độ huỳnh quang trung bình (MFI).

#### 2.3.5.4. Chụp kính hiển vi điện tử SEM

Tinh dầu *Citrus* ở 21mg/mL được thêm vào dung dịch chứa *S. aureus* ( $10^6$  cfu/mL) được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sau khi ủ, mẫu được ly tâm ở 1500g trong 10 phút và rửa hai lần bằng dung dịch PBS (0.1 M, pH 7.4). Tế bào vi khuẩn được cố định trong 2.5% glutaraldehyde trong 4 giờ ở 4°C. Các mẫu được khử nước trong etanol (30%, 50%, 80%, 90%, 100%), sau đó thay thế ethanol bằng bằng 100% rượu tertiary butyl. Cuối cùng, tất cả các mẫu đều được phủ vàng trong 2 phút, và chụp bằng kính hiển vi điện tử (FESEM, JSM 7401F, JEOL, Nhật Bản).

**2.3.6. Tối ưu hóa điều kiện tiền xử lý nguyên liệu trong trích ly tinh dầu Citrus bằng phương pháp chân không có hỗ trợ enzyme**

Các thí nghiệm đơn yếu tố được thực hiện để tìm ra các yếu tố chính ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu trích ly được. Trước khi chiết, vỏ Citrus được ngâm trong nước cất với nhiều tỷ lệ khác nhau (0.125-0.5 g/mL), ủ với pectinase (200-500 U / g) ở 40-55°C, pH-4.5 trong 30-120 phút. Đối với mẫu lá, tỷ lệ 0.15-0.35 g/mL nguyên liệu so với nước, 10-16 U/g nồng độ Viscozyme-L, thời gian ủ 60-150 phút được khảo sát. Tinh dầu vỏ và lá được chiết xuất bằng phương pháp chưng cất chân không ở áp suất 575mm Hg trong 3 giờ.

Sau khi xác định phạm vi của các biến thông qua thử nghiệm đơn yếu tố, phương pháp đáp ứng bề mặt được sử dụng để tìm ảnh hưởng của 3 thông số phản ứng đến hàm lượng tinh dầu trích ly được.

Bảng 2.3 : Ma trận quy hoạch thực nghiệm quá trình trích ly tinh dầu vỏ Citrus

<b>Yếu tố</b>	<b>Tên biến</b>	<b>Đơn vị</b>	<b>Biến thực</b>	<b>Biến thực</b>	<b>Biến mã hóa</b>	<b>Biến mã hóa</b>
A	Tỉ lệ nguyên liệu/nước	g/mL	0.25	0.5	-1	1
B	Thời gian ủ	Min	30	90	-1	1
C	Nồng độ pectinase	U/m L	150	450	-1	1

Bảng 2.4 Ma trận quy hoạch thực nghiệm quá trình trích ly tinh dầu lá Citrus

<b>Yếu tố</b>	<b>Tên biến</b>	<b>Đơn vị</b>	<b>Biến thực</b>	<b>Biến thực</b>	<b>Biến mã hóa</b>	<b>Biến mã hóa</b>
A	Tỉ lệ nguyên liệu/nước	g/mL	0.2	0.3	-1	1
B	Thời gian ủ	Min	60	120	-1	1
C	Nồng độ Viscozyme-L	U/mL	6	10	-1	1

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khảo sát tỉ trọng, thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của tinh dầu vỏ và lá *Citrus*

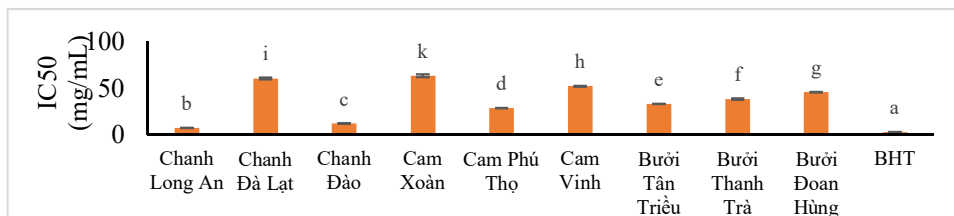
#### 3.1.1. Tỉ trọng của tinh dầu

Tỉ trọng tinh dầu các loại vỏ và lá *Citrus* được trình bày trong Bảng 3.1 và 3.2. Qua kết quả ta thấy, tỉ trọng của tinh dầu lá thuộc chi *Citrus* có giá trị nhỏ hơn 1 (nhẹ hơn nước).

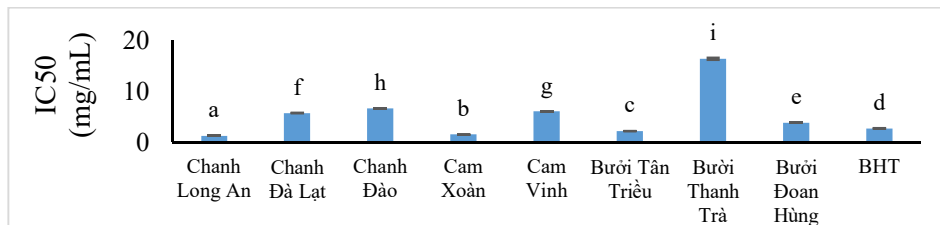
#### 3.1.2. Thành phần tinh dầu *Citrus*

Các thành phần chính của tinh dầu *Citrus* được trình bày trong Bảng 3.3 và 3.4. Tổng cộng có 9 hợp chất chính được tìm thấy trong các mẫu vỏ và 15 hợp chất chính được tìm thấy trong các mẫu lá. Thành phần chính của monoterpenes trong EOs vỏ và lá cam quýt là limonene. Limonene,  $\beta$ -pinene và myrcene được ghi nhận là 3 hợp chất chính trong EO ở vỏ trong khi limonene,  $\beta$ -pinene và citronellal là 3 hợp chất chính trong EO của lá.

#### 3.1.3. Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu *Citrus*



Hình 3.1 Giá trị IC<sub>50</sub> của tinh dầu vỏ *Citrus*.



Hình 3.2 Giá trị IC<sub>50</sub> của tinh dầu lá *Citrus*.

Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu vỏ và lá *Citrus* được thể hiện trong Hình 3.1 và 3.2. Tất cả các mẫu đều có hoạt tính chống oxy hóa. Các mẫu tinh dầu vỏ có IC50 từ 7.11-60.32mg/mL. Các mẫu lá có IC50 từ 1.21-16.4 mg/mL. Thành phần của tinh dầu có ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa. Hoạt tính chống oxy hóa cao được biết đến do hàm lượng terpene trong tinh dầu lớn.

Bảng 3.1 Tỷ trọng của tinh dầu vỏ ở 30°C

Tinh dầu	CLA	CD	CDL	CX	CV	CPT	BTTTr	BThT	BDH
Tỷ trọng (g/mL)	0.80±	0.77±	0.76±	0.84±	0.85±	0.82±	0.78±	0.88±	0.84±
	0.01 <sup>c</sup>	0.01 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.01 <sup>de</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.01 <sup>cd</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>f</sup>	0.01 <sup>e</sup>

Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ )

Bảng 3.2 Tỷ trọng của tinh dầu lá ở 30°C

Tinh dầu	CLA	CD	CDL	CX	CV	BTTTr	BThT	BDH
Tỷ trọng (g/mL)	0.91±	0.83±	0.83±	0.92±	0.85±	0.87±	0.85±	0.86±
	0.02 <sup>c</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.01 <sup>e</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>

Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ )

Bảng 3.3 Thành phần hóa học của tinh dầu vỏ (%w/w)

Cấu tử	CX	CV	CPT	BTTr	BThT	BDH	CLA	CDL	CD
$\alpha$ -pinene	0.61± 0.02 <sup>c</sup>	0.53± 0.02 <sup>b</sup>	0.59± 0.03 <sup>c</sup>	1.32± 0.01 <sup>f</sup>	0.93± 0.00 <sup>d</sup>	0.33± 0.00 <sup>a</sup>	1.12± 0.02 <sup>e</sup>	1.74± 0.02 <sup>h</sup>	1.50± 0.02 <sup>g</sup>
Sabinene	0.32±	0.28±	0.15±	0.20±	0.20±	0.16±	2.54±	1.76±	1.27±
$\beta$ -pinene	0.01 <sup>d</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.02 <sup>g</sup>	0.02 <sup>f</sup>	0.00 <sup>e</sup>
myrcene	0.02±	0.02±	0.14±	0.97±	0.85±	0.29±	14.58±	6.73±	6.10±
	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.31 <sup>h</sup>	0.07 <sup>g</sup>	0.02 <sup>f</sup>
limonene	2.10±	2.67±	2.16±	2.16±	26.43±	41.95±	0.96±	1.68±	1.78±
	0.10 <sup>d</sup>	0.08 <sup>e</sup>	0.05 <sup>d</sup>	0.01 <sup>d</sup>	0.01 <sup>f</sup>	0.02 <sup>g</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.02 <sup>c</sup>
$\alpha$ -terpinene	0.15±	0.42±	---	0.33±	0.17±	---	0.08±	0.18±	0.19±
	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>e</sup>	---	0.01 <sup>d</sup>	0.01 <sup>c</sup>	---	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>
limonene	94.25±	94.35±	95.78±	80.55±	58.44±	42.93±	40.29±	53.41±	70.56±
	1.37 <sup>g</sup>	1.76 <sup>h</sup>	1.69 <sup>i</sup>	0.06 <sup>f</sup>	0.02 <sup>d</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.29 <sup>c</sup>	0.15 <sup>e</sup>
terpinolene	Tr	0.02±	0.02±	0.03±	0.20±	0.07±	0.57±	0.21±	0.30±
	Tr	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
$\gamma$ -terpinene	Tr	0.02±	Tr	10.90±	7.63±	0.10±	2.61±	12.14±	10.40±
	Tr	0.00 <sup>a</sup>	0.43±0.02 <sup>f</sup>	0.01 <sup>f</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.02 <sup>c</sup>	0.21 <sup>g</sup>	0.04 <sup>e</sup>
Linalool	0.30±	0.39±	0.43±0.02 <sup>f</sup>	Tr	0.11±	0.04±	0.31±	0.30±	0.17±
	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.02 <sup>f</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>

Các ký tự giống nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Bảng 3.4 Thành phần hóa học của tinh dầu lá (%w/w)

Cấu tử	CX	CV	BTr	BThT	BDH	CLA	CDL	CD
$\alpha$ -pinene	1.30±0.02 <sup>f</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	0.98±0.01 <sup>c</sup>	1.50±0.01 <sup>g</sup>	0.31±0.00 <sup>a</sup>	1.79±0.02 <sup>h</sup>	0.53±0.02 <sup>c</sup>	0.59±0.02 <sup>d</sup>
$\beta$ -pinene	16.93±0.02 <sup>f</sup>	1.69±0.02 <sup>a</sup>	2.70±0.01 <sup>b</sup>	9.68±0.05 <sup>e</sup>	---	19.27±0.02 <sup>g</sup>	3.77±0.02 <sup>c</sup>	4.31±0.00 <sup>d</sup>
myrcene	4.73±0.02 <sup>g</sup>	3.9±0.01 <sup>f</sup>	1.99±0.02 <sup>e</sup>	1.76±0.01 <sup>d</sup>	0.32±0.00 <sup>a</sup>	---	0.43±0.07 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>c</sup>
limonene	13.78±0.09 <sup>c</sup>	14.33±0.00 <sup>d</sup>	21.87±0.01 <sup>e</sup>	12.21±0.01 <sup>a</sup>	13.33±0.07 <sup>b</sup>	30.11±0.07 <sup>h</sup>	26.73±0.10 <sup>f</sup>	28.19±0.08 <sup>g</sup>
(Z)- $\beta$ -ocimene	7.49±0.06 <sup>f</sup>	1.90±0.02 <sup>b</sup>	6.35±0.03 <sup>c</sup>	3.91±0.04 <sup>d</sup>	---	3.49±0.00 <sup>c</sup>	---	0.11±0.00 <sup>a</sup>
$\gamma$ -terpinene	2.06±0.01 <sup>f</sup>	0.51±0.01 <sup>c</sup>	2.59±0.01 <sup>g</sup>	4.34±0.02 <sup>h</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>	1.18±0.00 <sup>c</sup>	0.3±0.00 <sup>b</sup>	0.81±0.00 <sup>d</sup>
p-cymene	---	---	---	4.94±0.06 <sup>c</sup>	1.51±0.05 <sup>a</sup>	---	---	3.27±0.05 <sup>b</sup>
linalool	5.74±0.01 <sup>f</sup>	---	1.17±0.06 <sup>a</sup>	---	3.09±0.07 <sup>c</sup>	1.71±0.02 <sup>d</sup>	1.24±0.21 <sup>b</sup>	1.55±0.04 <sup>c</sup>
citronellal	0.70±0.00 <sup>b</sup>	4.16±0.04 <sup>c</sup>	0.51±0.00 <sup>a</sup>	---	4.94±0.09 <sup>d</sup>	13.97±0.00 <sup>e</sup>	26.82±0.04 <sup>f</sup>	32.38±0.05 <sup>g</sup>
terpinen-4-ol	5.74±0.01 <sup>f</sup>	1.21±0.04 <sup>d</sup>	---	---	0.79±0.01 <sup>c</sup>	1.83±0.01 <sup>c</sup>	0.29±0.00 <sup>b</sup>	0.13±0.00 <sup>a</sup>
nerol	3.79±0.06 <sup>b</sup>	---	10.37±0.08 <sup>c</sup>	---	1.07±0.00 <sup>a</sup>	---	---	---
geranial	5.62±0.08 <sup>c</sup>	2.30±0.01 <sup>c</sup>	3.29±0.00 <sup>d</sup>	---	17.73±0.08 <sup>f</sup>	1.97±0.01 <sup>b</sup>	1.31±0.02 <sup>a</sup>	1.95±0.02 <sup>b</sup>
neral	0.08±0.03 <sup>a</sup>	3.09±0.05 <sup>e</sup>	4.17±0.07 <sup>f</sup>	2.43±0.02 <sup>d</sup>	11.55±0.07 <sup>g</sup>	1.38±0.01 <sup>b</sup>	1.64±0.02 <sup>c</sup>	2.44±0.01 <sup>d</sup>
citronellol	---	1.71±0.01 <sup>b</sup>	3.19±0.04 <sup>c</sup>	---	1.09±0.01 <sup>a</sup>	---	4.21±0.09 <sup>d</sup>	4.50±0.05 <sup>e</sup>
$\beta$ -caryophyllene	1.86±0.02 <sup>c</sup>	4.06±0.02 <sup>f</sup>	6.76±0.03 <sup>b</sup>	4.44±0.07 <sup>g</sup>	2.55±0.01 <sup>d</sup>	3.37±0.00 <sup>c</sup>	0.60±0.00 <sup>b</sup>	0.30±0.00 <sup>a</sup>

Các ký tự giống nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.4. Hoạt tính kháng khuẩn

Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ và lá *Citrus* được thể hiện trong Bảng 3.5 và 3.6. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu tinh dầu đều có khả năng kháng khuẩn mạnh trên các chủng vi sinh vật kiểm định. Riêng tinh dầu lá cam Xoàn không cho thấy khả năng ức chế *P.aeruginosa*.

Bảng 3.5. Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ (mm)

	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>
CD	24.00 ± 0.25 <sup>c</sup>	26.67 ± 0.29 <sup>f</sup>	28.67 ± 0.29 <sup>e</sup>	28.83 ± 0.29 <sup>f</sup>
CDL	21.67 ± 0.29 <sup>cd</sup>	22.42 ± 0.38 <sup>d</sup>	22.33 ± 0.38 <sup>c</sup>	23.17 ± 0.14 <sup>d</sup>
CLA	23.82 ± 0.52 <sup>c</sup>	28.17 ± 0.29 <sup>g</sup>	23.33 ± 0.29 <sup>d</sup>	26.33 ± 0.29 <sup>e</sup>
CX	20.67 ± 0.14 <sup>ab</sup>	17.17 ± 0.29 <sup>a</sup>	19.00 ± 0.25 <sup>a</sup>	17.08 ± 0.14 <sup>a</sup>
CV	20.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	24.17 ± 0.29 <sup>e</sup>	23.58 ± 0.14 <sup>d</sup>	23.00 ± 0.00 <sup>cd</sup>
CPT	20.92 ± 0.14 <sup>bc</sup>	18.42 ± 0.14 <sup>b</sup>	20.58 ± 0.14 <sup>b</sup>	20.33 ± 0.29 <sup>b</sup>
BDH	27.17 ± 0.29 <sup>f</sup>	26.17 ± 0.29 <sup>f</sup>	22.33 ± 0.29 <sup>c</sup>	22.58 ± 0.38 <sup>cd</sup>
BThT	21.58 ± 0.14 <sup>cd</sup>	24.83 ± 0.14 <sup>c</sup>	21.83 ± 0.14 <sup>c</sup>	22.42 ± 0.14 <sup>c</sup>
BTr	26.83 ± 0.14 <sup>f</sup>	20.42 ± 0.14 <sup>c</sup>	20.08 ± 0.14 <sup>b</sup>	20.42 ± 0.14 <sup>b</sup>
Streptomycin	23.53 ± 0.20 <sup>e</sup>	23.60 ± 0.30 <sup>e</sup>	21.50 ± 0.20 <sup>c</sup>	22.60 ± 0.30 <sup>cd</sup>

Các ký tự giống nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ )

Bảng 3.6. Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu lá (mm)

	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>
CD	12.67 ± 0.14 <sup>a</sup>	11.17 ± 0.14 <sup>a</sup>	15.13 ± 0.13 <sup>d</sup>	10.21 ± 0.07 <sup>a</sup>
CDL	13.29 ± 0.19 <sup>b</sup>	22.83 ± 0.14 <sup>e</sup>	15.17 ± 0.07 <sup>d</sup>	21.21 ± 0.07 <sup>d</sup>
CLA	20.08 ± 0.14 <sup>c</sup>	21.08 ± 0.14 <sup>d</sup>	14.67 ± 0.14 <sup>c</sup>	20.13 ± 0.13 <sup>c</sup>
CX	23.25 ± 0.25 <sup>f</sup>	21.00 ± 0.25 <sup>d</sup>	9.00 ± 0.14 <sup>a</sup>	20.17 ± 0.14 <sup>c</sup>
CV	20.25 ± 0.25 <sup>cd</sup>	18.08 ± 0.14 <sup>c</sup>	21.42 ± 0.14 <sup>e</sup>	12.58 ± 0.14 <sup>b</sup>
BDH	20.17 ± 0.29 <sup>cd</sup>	40.17 ± 0.29 <sup>g</sup>	45.17 ± 0.29 <sup>f</sup>	30.33 ± 0.29 <sup>f</sup>
BThT	20.75 ± 0.25 <sup>d</sup>	12.17 ± 0.14 <sup>b</sup>	14.67 ± 0.14 <sup>c</sup>	10.17 ± 0.14 <sup>a</sup>
BTr	22.42 ± 0.14 <sup>e</sup>	24.08 ± 0.14 <sup>f</sup>	12.08 ± 0.14 <sup>b</sup>	24.33 ± 0.14 <sup>e</sup>
Streptomycin	23.53 ± 0.20 <sup>e</sup>	23.60 ± 0.30 <sup>e</sup>	21.50 ± 0.20 <sup>c</sup>	22.60 ± 0.30 <sup>cd</sup>



Các ký tự giống nhau trong cùng 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Tác động của tinh dầu lên vi khuẩn

#### 3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn của từng thành phần chính và hỗn hợp các thành phần chính của tinh dầu

Tinh dầu vỏ chanh đào (VCD), vỏ bưởi Tân Triều (VBTr), vỏ cam Xoàn (VCX), lá chanh Long An (LCLA) đại diện cho mỗi loại *Citrus* có hoạt tính kháng khuẩn tốt nên được dùng trong thí nghiệm này.

Hiện nay, ngộ độc thực phẩm là mối quan tâm lớn trên toàn thế giới. Trong số các vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, *S. aureus* là tác nhân hàng đầu gây viêm dạ dày do tiêu thụ thực phẩm bị ô nhiễm. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, *S. aureus* nhạy cảm với các mẫu tinh dầu hơn các vi khuẩn. Do đó, *S. aureus* được sử dụng cho các thí nghiệm về tác động của tinh dầu ở phần sau.

Limonene,  $\beta$ -pinene chiết xuất từ tinh dầu vỏ; limonene,  $\beta$ -pinene, citronellal chiết xuất từ tinh dầu lá và myrcene mua từ Sigma-Aldrich được sử dụng trong nghiên cứu. Sau đó, các thành phần riêng lẻ được trộn theo tỷ lệ thể hiện trong Bảng 3.7. Hoạt động của bốn thành phần và hỗn hợp (HH) các thành phần chính của tinh dầu tác động lên *S. aureus* được trình bày trong Bảng 3.8. Hoạt tính kháng khuẩn của các thành phần riêng lẻ thấp hơn so với các tinh dầu và các hỗn hợp. Kết quả có thể được giải thích rằng sự kết hợp của các thành phần riêng lẻ trong một hỗn hợp có thể gây ra tác dụng hiệp đồng đối với vi khuẩn.

Bảng 3.7 Tỷ lệ kết hợp các thành phần trong tinh dầu

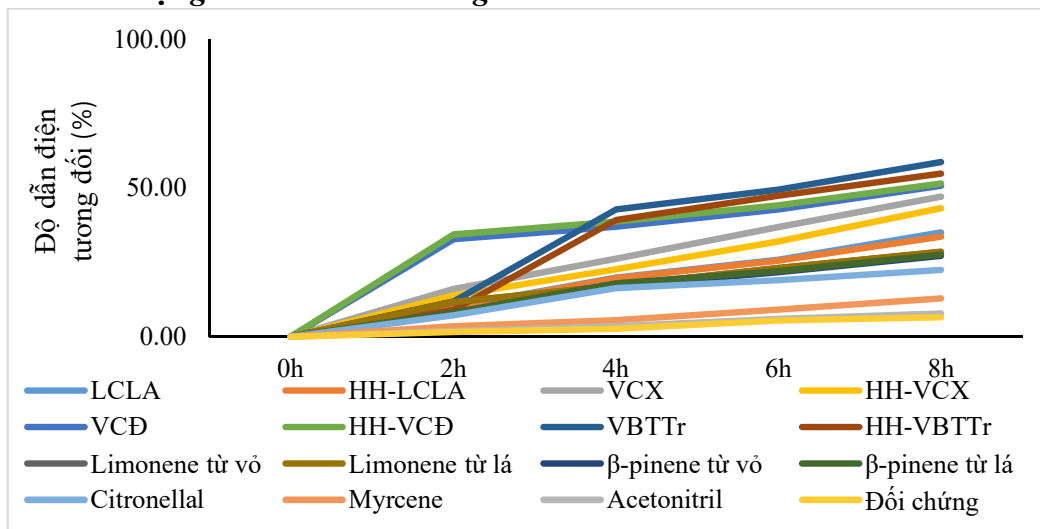
EOs	Limonene	$\beta$ -pinene	Myrcene	Citronellal	ACN
HH-VCX	94.25	0.02	2.10	---	3.63
HH-VBTr	80.55	0.97	2.16	---	16.32
HH-VCD	70.56	6.10	1.78	---	21.56
HH-LCLA	30.11	19.27	---	13.97	36.65

Bảng 3.8 Đường kính vòng kháng khuẩn của từng thành phần chính và hỗn hợp các thành phần ức chế *S.aureus* (mm)

Thành phần	Đường kính
Limonene từ vỏ	16.33±0.29 <sup>d</sup>
Limonene từ lá	16.17±0.29 <sup>d</sup>
β-pinene từ vỏ	14.08±0.14 <sup>c</sup>
β-pinene từ lá	14.17±0.29 <sup>c</sup>
Myrcene	09.00±0.00 <sup>a</sup>
Citronellal	12.42±0.14 <sup>b</sup>
HH-VCD	24.83±0.14 <sup>c</sup>
HH-VCX	19.08±0.14 <sup>b</sup>
HH-VBTr	24.17±0.14 <sup>d</sup>
HH-LCLA	20.17±0.14 <sup>c</sup>

Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.2. Tác động đến tính thấm màng tế bào

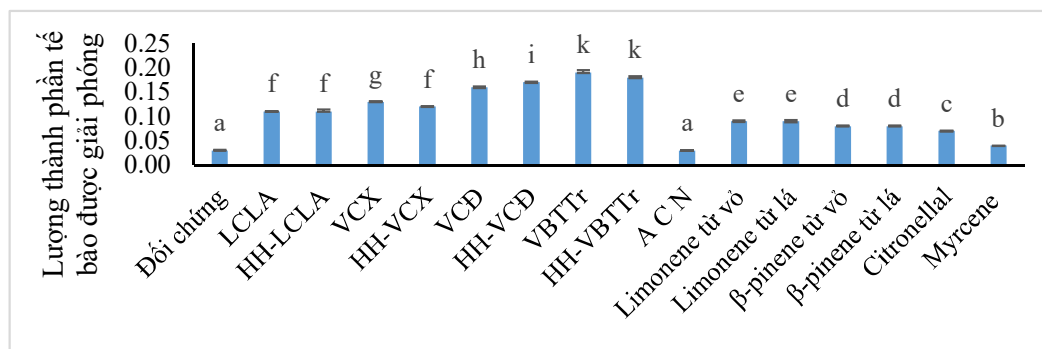


Hình 3.3 Tác động của các mẫu lên tính thấm màng tế bào

Hình 3.3 cho thấy ảnh hưởng của các mẫu thử đối với độ dẫn điện tương đối (REC) của *S.aureus*. Sự tăng REC làm tăng tính thấm của màng tế bào vi khuẩn.

Như đã thấy trong hình, độ dẫn điện tương đối tạo ra do mẫu chứa tinh dầu nguyên chất cao hơn so với mẫu chứa thành phần riêng lẻ. Ngoài ra, sự khác biệt độ dẫn điện tương đối giữa mẫu chứa tinh dầu nguyên chất và hỗn hợp các thành phần không quá lớn. Tính thấm của màng tế bào tăng gây ra sự rò rỉ các thành phần nội bào, đặc biệt là mất các chất điện giải bao gồm  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ . Các ion này là chất điện giải cần thiết để duy trì trạng thái năng lượng, điều hòa chuyển hóa và vận chuyển chất tan. Do đó, những thay đổi nhỏ trong cấu trúc của màng có thể gây tác động xấu đến quá trình trao đổi chất của tế bào và gây chết tế bào..

### 3.2.3. Tác động đến tính toàn vẹn màng tế bào

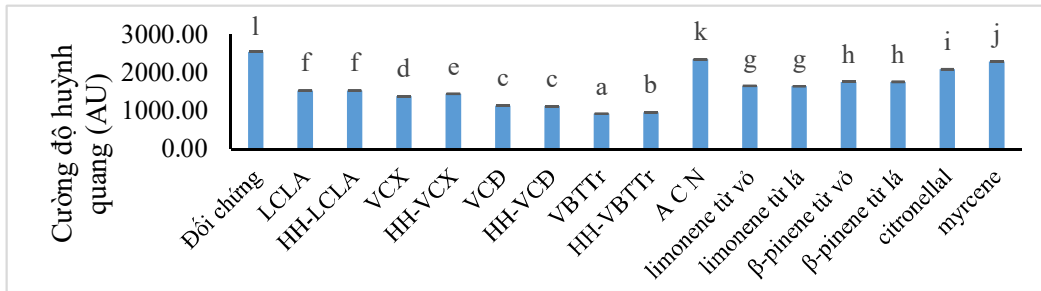


Hình 3.4 Độ hấp thụ của mẫu chứa tinh dầu *Citrus* ở 260 nm

Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Việc giải phóng thành phần tế bào hấp thụ ở bước sóng 260 nm của phần dung dịch nổi phía trên khi xử lý với các mẫu thử được sử dụng để xác định tính toàn vẹn của màng tế bào. Hình 3.4 cho thấy kết quả khi *S.aureus* được xử lý với các mẫu. Kết quả này chứng minh rằng màng tế bào đã bị phá vỡ, dẫn đến mất các đại phân tử và gây chết tế bào. Như đã thấy trong hình, độ dẫn điện tương đối được xử lý bởi các tinh dầu nguyên chất cao hơn so với độ dẫn điện được xử lý bởi các thành phần riêng lẻ. Ngoài ra, sự khác biệt giữa tác động của tinh dầu nguyên chất và hỗn hợp các thành phần không lớn.

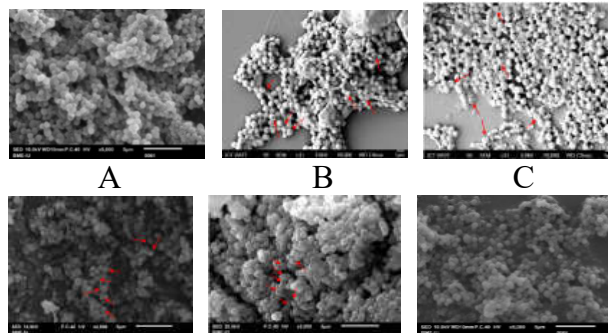
### 3.2.4. Tác động đến điện thế màng tế bào

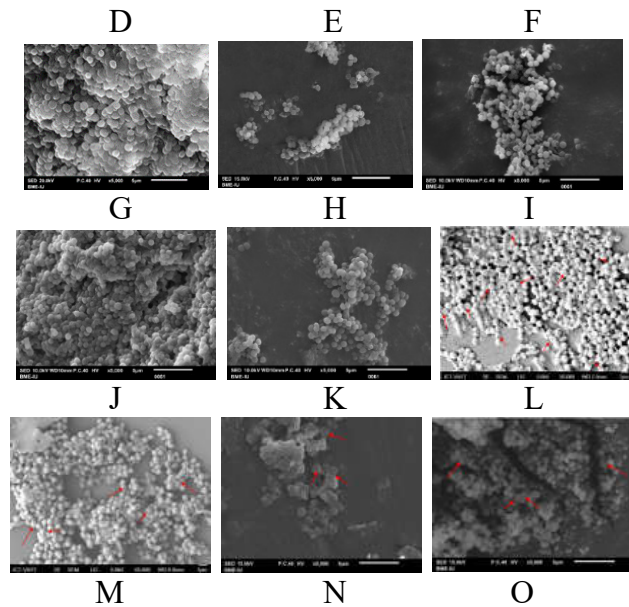


Hình 3.5 Điện thế màng tế bào của *S.aureus* được xử lý với tinh dầu *Citrus*. Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Hình 3.5 cho thấy kết quả điện thế màng của *S.aureus* được xử lý với các mẫu thông qua dữ liệu về cường độ huỳnh quang trung bình (CĐHQTB) của Rhodamine 123. Sau khi thêm các mẫu thử vào dung dịch chứa vi khuẩn, CĐHQTB đã giảm nhanh so với mẫu đối chứng. Điện thế màng được đo bằng sự chênh lệch thế điện hóa của proton xuyên màng, tham gia vào quá trình sản xuất ATP. Sự giảm điện thế màng dẫn đến sự ức chế chuỗi vận chuyển điện tử, dẫn đến giảm sản xuất ATP ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của tế bào và làm chết tế bào. Như đã thấy trong hình, độ dẫn điện tương đối được xử lý bởi các tinh dầu nguyên chất cao hơn so với độ dẫn điện được xử lý bởi các thành phần riêng lẻ. Ngoài ra, sự khác biệt giữa các tinh dầu và hỗn hợp các thành phần không lớn.

### 3.2.5. SEM





Hình 3.6 Hình chụp SEM của tế bào *S. aureus*

A: mẫu đối chứng; B: tế bào được xử lý bằng VBTT; C: tế bào được xử lý bằng VCD; D: tế bào được xử lý bằng VCX; E: tế bào được xử lý bằng LCLA; F: tế bào được xử lý bằng limonene từ vỏ; G: tế bào được xử lý bằng limonene từ lá; H: Tế bào được xử lý bằng  $\beta$ -pinene từ vỏ; I: tế bào được xử lý bằng  $\beta$ -pinene từ lá; J: tế bào được xử lý bằng myrcene; K: tế bào được xử lý bằng citronellal; L: tế bào được xử lý bằng HH-VBTT; M: tế bào được xử lý bằng HH-VCD; N: tế bào được xử lý bằng HH-VCX; O: tế bào được xử lý bằng HH-LCLA.

Hình 3.6 cho thấy các thay đổi hình thái đã xuất hiện ở màng tế bào. Các tế bào còn nguyên vẹn được quan sát thấy ở mẫu đối chứng và các mẫu xử lý với limonene, citronellal, myrcene, trong khi cấu trúc màng bị biến dạng và các tế bào teo lại xuất hiện ở mẫu xử lý với tinh dầu nguyên chất và hỗn hợp các thành phần.

### 3.3. Tối ưu hóa điều kiện tiên xử lý nguyên liệu trong trích ly tinh dầu

#### 3.3.1. So sánh thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn của tinh dầu trích ly bằng 3 phương pháp

##### 3.3.1.1. Thành phần hóa học của tinh dầu trích ly bằng 3 phương pháp

Chanh là đối tượng nghiên cứu thích hợp trong thí nghiệm này so với các giống *Citrus* khác vì lá chanh được thu hoạch quanh năm với số lượng lớn. Bên cạnh đó, trong phần này cần khảo sát khả năng ức chế đối với 4 loại vi khuẩn để đánh giá chung hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chọn ra phương pháp trích ly thích hợp nhất. Vì vậy, vỏ và lá chanh Đà Lạt được lựa chọn vì có hoạt tính kháng khuẩn cao đối với cả 4 loại vi khuẩn được thử nghiệm. Vỏ và lá chanh Đà Lạt được chiết xuất bằng ba phương pháp: lôi cuốn hơi nước, chưng cất chân không và chưng cất chân không có hỗ trợ enzyme. Phương pháp chưng cất chân không được sử dụng trong thí nghiệm này vì tinh dầu được chiết xuất bằng phương pháp này ít bị ảnh hưởng bởi nhiệt hơn so với phương pháp lôi cuốn hơi nước. Tuy nhiên, lượng tinh dầu trích ly được của phương pháp này lại không cao. Phương pháp có hỗ trợ của enzyme theo kết quả của những nghiên cứu trước cho thấy lượng tinh dầu trích ly được khá cao và ít tác động đến chất lượng của tinh dầu so với các phương pháp truyền thống. Qua số liệu ở Bảng 3.9 và 3.10, sự khác biệt giữa tinh dầu chưng cất chân không và tinh dầu chưng cất chân không có enzyme hỗ trợ là nhỏ, trong khi sự khác biệt về thành phần hóa học giữa tinh dầu chưng cất bằng lôi cuốn hơi nước và tinh dầu chưng cất chân không là khá lớn. Sự khác biệt lớn này là do nhiệt độ cao sử dụng trong quá trình lôi cuốn hơi nước khiến một số cấu tử bị biến đổi hoặc bay hơi.

Bảng 3.9 Thành phần hóa học của tinh dầu vỏ chanh Đà Lạt trích ly bằng 3 phương pháp

STT	Cấu tử	Chân không	Chân không có hỗ trợ enzyme	Lôi cuốn hơi nước
1	$\alpha$ -pinene	$1.91 \pm 0.02^c$	$0.72 \pm 0.02^b$	$0.14 \pm 0.02^a$
2	Sabinene	$1.85 \pm 0.04^a$	---	---

3	$\beta$ -pinene	11.02±0.06 <sup>c</sup>	9.52±0.00 <sup>b</sup>	5.74±0.31 <sup>a</sup>
4	myrcene	1.36±0.03 <sup>b</sup>	0.99±0.02 <sup>a</sup>	5.38±0.08 <sup>c</sup>
5	$\alpha$ -terpinene	11.41±0.13 <sup>b</sup>	10.11±0.00 <sup>a</sup>	---
6	limonene	56.04±0.28 <sup>c</sup>	55.75±0.38 <sup>b</sup>	38.24±0.06 <sup>a</sup>
7	terpinolene	0.17±0.00 <sup>a</sup>	0.47±0.00 <sup>b</sup>	---
8	$\gamma$ -terpinene	2.25±0.07 <sup>c</sup>	1.19±0.02 <sup>b</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>
9	Linalool	0.26±0.00 <sup>a</sup>	0.35±0.00 <sup>b</sup>	0.60±0.00 <sup>c</sup>

Các ký tự giống nhau trong 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Bảng 3.10 Thành phần hóa học của tinh dầu lá chanh Đà Lạt trích ly bằng 3 phương pháp

STT	Cấu tử	Chân không	Chân không có hỗ trợ enzyme	Lôi cuốn hơi nước
1	$\alpha$ -pinene	0.53±0.02 <sup>c</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>
2	1-heptanol	5.51±0.04 <sup>a</sup>	6.68±0.02 <sup>b</sup>	8.89±0.02 <sup>c</sup>
3	$\beta$ -pinene	3.77±0.06 <sup>c</sup>	3.43±0.01 <sup>b</sup>	2.97±0.01 <sup>a</sup>
4	myrcene	0.43±0.03 <sup>b</sup>	0.16±0.02 <sup>a</sup>	---
5	limonene	26.73±0.08 <sup>c</sup>	13.35±0.00 <sup>b</sup>	11.11±0.02 <sup>a</sup>
6	1,8-cineole	2.02±0.03 <sup>a</sup>	2.92±0.01 <sup>b</sup>	3.05±0.01 <sup>c</sup>
7	$\gamma$ -terpinene	0.30±0.00 <sup>a</sup>	0.34±0.00 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>c</sup>
8	linalool	1.24±0.07 <sup>a</sup>	1.37±0.02 <sup>b</sup>	2.32±0.01 <sup>c</sup>
9	citronellal	26.82±0.12 <sup>a</sup>	28.77±0.07 <sup>b</sup>	37.72±0.00 <sup>c</sup>
10	terpinen-4-ol	0.29±0.04 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>b</sup>	2.67±0.04 <sup>c</sup>
11	neral	1.31±0.01 <sup>a</sup>	1.73±0.02 <sup>b</sup>	1.91±0.01 <sup>c</sup>
12	$\beta$ -caryophyllene	0.60±0.01 <sup>a</sup>	1.91±0.01 <sup>b</sup>	4.57±0.02 <sup>c</sup>

Các ký tự giống nhau trong 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.1.2. Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu trích ly bằng 3 phương pháp

Bảng 3.11 IC50 của tinh dầu tách bằng 3 phương pháp

Tinh dầu	Chân không	Chân không có hỗ trợ enzyme	Lôi cuốn hơi nước
Vỏ	7.35±0.14 <sup>a</sup>	8.10±0.20 <sup>b</sup>	21.00±0.31 <sup>c</sup>

Lá	4.52±0.01 <sup>a</sup>	4.66±0.00 <sup>b</sup>	5.80±0.06 <sup>c</sup>
----	------------------------	------------------------	------------------------

Các ký tự giống nhau trong 1 hàng chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Bảng 3.11 cho thấy sự khác biệt về giá trị IC50 giữa tinh dầu trích ly bằng chung cất chân không và tinh dầu trích ly bằng chung cất chân không có hỗ trợ enzyme là nhỏ. Tuy nhiên, có sự khác biệt lớn về giá trị IC50 giữa tinh dầu trích ly bằng chung cất chân không và tinh dầu trích ly bằng lôi cuốn hơi nước. Khả năng chống oxy hóa được phát hiện có liên quan đến thành phần của tinh dầu. Trong nghiên cứu này, tinh dầu chung cất chân không và chung cất chân không có hỗ trợ enzyme có thành phần chính là limonene và  $\beta$ -pinene cho hoạt tính chống oxy hóa cao. Do đó, hai hợp chất này có thể tác động đến hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu *Citrus*.

### 3.3.1.3. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trích ly bằng 3 phương pháp

Bảng 3.12 Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu vỏ tách bằng 3 phương pháp ức chế *S.aureus*

Phương pháp	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>
Chân không	21.08±0.14 <sup>a</sup>	22.42±0.38 <sup>a</sup>	22.08±0.14 <sup>a</sup>	23.00±0.00 <sup>a</sup>
Chân không có hỗ trợ enzyme	19.92±0.14 <sup>b</sup>	21.00±0.00 <sup>b</sup>	20.83±0.29 <sup>b</sup>	22.08±0.14 <sup>b</sup>
Lôi cuốn hơi nước	15.08±0.14 <sup>c</sup>	16.08±0.14 <sup>c</sup>	16.17±0.29 <sup>c</sup>	14.33±0.14 <sup>c</sup>

Các ký tự giống nhau trong 1 cột chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

Bảng 3.13 Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu lá tách bằng 3 phương pháp ức chế *S.aureus*

Phương pháp	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>
Chân không	17.17±0.14 <sup>c</sup>	24.08±0.14 <sup>b</sup>	18.00±0.00 <sup>c</sup>	22.67±0.29 <sup>c</sup>
Chân không có hỗ trợ enzyme	16.33±0.29 <sup>b</sup>	23.67±0.29 <sup>b</sup>	17.17±0.29 <sup>b</sup>	22.00±0.00 <sup>b</sup>
Lôi cuốn hơi nước	13.29±0.19 <sup>a</sup>	22.83±0.14 <sup>a</sup>	15.17±0.07 <sup>a</sup>	21.21±0.0a

Các ký tự giống nhau trong 1 cột chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0.05$ ).

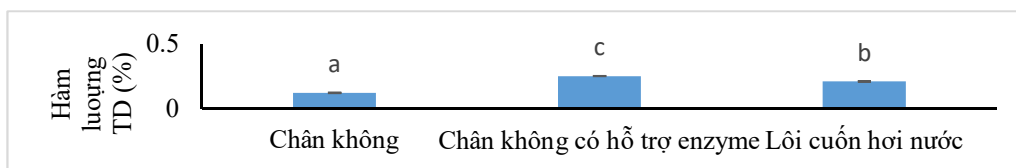


Bảng 3.12 và 3.13, minh họa hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu vỏ và lá chanh Đà Lạt. Sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn giữa tinh dầu chưng cất lõi cuộn hơi nước và chưng cất chân không là khá lớn, trong khi sự khác biệt giữa tinh dầu chưng cất chân không có enzyme hỗ trợ và tinh dầu chưng cất chân không là nhỏ. Hoạt tính kháng khuẩn được phát hiện có liên quan đến thành phần hóa học của tinh dầu. Trong nghiên cứu này, phát hiện ở thí nghiệm trên cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu vỏ liên quan đến sự kết hợp của limonene,  $\beta$ -pinene và myrcene, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu lá liên quan đến sự kết hợp của limonene,  $\beta$ -pinene và citronellal trong dầu lá. Do đó, tinh dầu vỏ và lá trích ly bằng 2 phương pháp: chưng cất chân không và chưng cất chân không có enzyme hỗ trợ cho hàm lượng limonene,  $\beta$ -pinene, myrcene và citronellal cao nên có hoạt tính kháng khuẩn cao.

#### 3.3.1.4. Hàm lượng tinh dầu Citrus bằng 3 phương pháp



Hình 3.7 Hàm lượng tinh dầu vỏ chanh Đà Lạt bằng 3 phương pháp. Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).



Hình 3.78 Hàm lượng tinh dầu lá chanh Đà Lạt bằng 3 phương pháp. Các ký tự giống nhau chỉ sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).

Hàm lượng tinh dầu vỏ và lá chanh Đà Lạt trích ly bằng 3 phương pháp được thể hiện ở Hình 3.7 và 3.8. Mặc dù hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa của tinh

dầu chiết xuất bằng phương pháp chưng cất chân không là cao nhất, nhưng hàm lượng tinh dầu trích ly bằng phương pháp này lại thấp nhất. Hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa của tinh dầu chiết xuất bằng phương pháp chưng cất chân không có sự hỗ trợ của enzyme ở mức trung bình. Tuy nhiên, hàm lượng tinh dầu trích ly bằng phương pháp này thu được cao nhất. Điều này có thể được lý giải là do enzyme pectinase và viscozyme-L đã phá vỡ cấu trúc và tính toàn vẹn của thành tế bào của vỏ và lá *Citrus*, làm tăng hàm lượng tinh dầu trích ly được. Do đó, phương pháp chưng cất chân không có sự hỗ trợ của enzyme là phương pháp lý tưởng để chiết xuất tinh dầu *Citrus*.

### 3.3.2. Tối ưu điều kiện tiền xử lý nguyên liệu trong trích ly tinh dầu vỏ *Citrus*

Sau khi phân tích dữ liệu, phương trình hồi quy mô tả hàm lượng tinh dầu như sau:

$$\text{Hàm lượng tinh dầu} = 6.18 + 13.5 A + 0.036 AB - 20.96 A^2 - 0.000369 B^2 - 0.000025 C^2$$

Trong đó A là tỉ lệ nguyên liệu/nước, B là thời gian ủ, C là nồng độ pectinase.

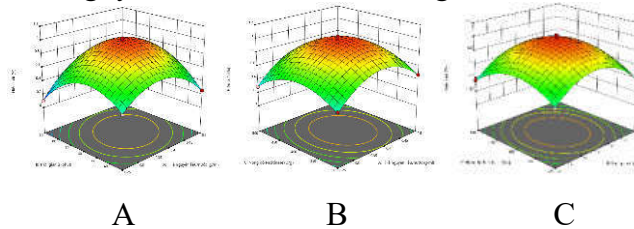


Figure 3.8 Đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của (A) tỉ lệ nguyên liệu/ nước và thời gian ủ ở nồng độ pectinase 400u/g; (B) tỉ lệ nguyên liệu/ nước và nồng độ pectinase ở thời gian ủ 60 phút; (C) thời gian ủ và nồng độ pectnase ở tỉ lệ nguyên liệu/nước 0.375 g/mL

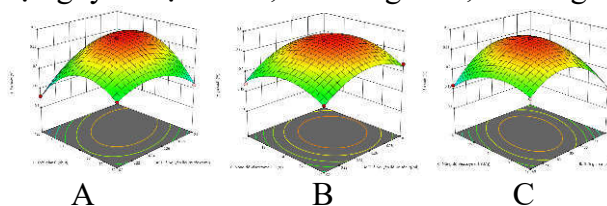
Tỷ lệ nguyên liệu trên nước là 0.39 g/mL, thời gian ủ 60.69 phút và nồng độ pectinase là 398.05 U/g là các điều kiện tối ưu để thu được hàm lượng tinh dầu cao nhất là 0.98%.

### 3.3.3. Tối ưu điều kiện tiền xử lý nguyên liệu trong trích ly tinh dầu lá *Citrus*

Sau khi phân tích dữ liệu, phương trình hồi quy mô tả hàm lượng tinh dầu như sau:

$$\text{Hàm lượng tinh dầu} = -1.755 + 4.9 A + 0.021667 AB + 0.000417 BC - 15 A^2 - 0.000067 B^2 - 0.008750 C^2$$

Trong đó A: tỉ lệ nguyên liệu/nước, B: thời gian ủ, C: nồng độ Viscozyme-L



Hình 3.9 Đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của (A) tỉ lệ nguyên liệu/nước và thời gian ủ ở nồng độ Viscozyme L 14U/g; (B) tỉ lệ nguyên liệu/nước và nồng độ pectinase ở thời gian ủ 90 phút; (C) thời gian ủ và nồng độ Viscozyme L ở tỉ lệ nguyên liệu/nước 0.25 g/mL

Tỷ lệ nguyên liệu trên nước là 0.26 g/mL, thời gian ủ 71.25 phút và nồng độ pectinase là 14.46 U/g là các điều kiện tối ưu để thu được hàm lượng tinh dầu cao nhất là 0.28%.

## CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Limonene,  $\beta$ -pinene và myrcene là thành phần chính của tinh dầu vỏ *Citrus*; limonene,  $\beta$ -pinene, và citronellal là các thành phần chính của tinh dầu lá *Citrus*.

Tất cả tinh dầu *Citrus* đều có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao. Tinh dầu lá chanh Long An có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất với IC50 là 1.21mg/mL. Tinh dầu *Citrus* cho thấy tác động ức chế mạnh lên *S.aureus* hơn các chủng vi khuẩn khác. Tinh dầu vỏ bưởi Tân Triều biểu hiện khả năng ức chế *S. aureus* mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 26.83mm.

Tinh dầu *Citrus* và hỗn hợp các thành phần chính tác động đến tính thấm, tính toàn vẹn và điện thế màng của tế bào vi khuẩn, dẫn đến vi khuẩn bị ức chế bởi tinh dầu. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của hỗn hợp các thành phần chính khá cao trong khi hoạt tính kháng khuẩn của từng thành phần chính lại khá thấp. Do đó, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu *Citrus* do sự kết hợp của các thành phần chính.

Phương pháp chưng cất chân không có sự hỗ trợ của enzym đã cải thiện hàm lượng tinh dầu thu được và hạn chế tác động đến thành phần hóa học của tinh dầu. Tỷ lệ nguyên liệu trên nước là 0.39 g/mL, thời gian ủ 60.69 phút và nồng độ pectinase là 398.05 U/g là các điều kiện tối ưu để thu được hàm lượng tinh dầu vỏ *Citrus* cao nhất là 0.98%. Tỷ lệ nguyên liệu trên nước là 0,26 g/mL, thời gian ủ 71.25 phút và nồng độ pectinase là 14.46 U/g là các điều kiện tối ưu để thu được hàm lượng tinh dầu lá *Citrus* cao nhất là 0.28%.

#### **4.2. Kiến nghị**

Đề tài là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo trong tương lai:

- Nghiên cứu các phương pháp trích ly khác để tìm ra phương pháp trích ly tinh dầu cho lượng tinh dầu, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao.
- Nghiên cứu thành phần hóa học và tính chất chức năng của tinh dầu *Citrus* ở các thời điểm thu hoạch và bảo quản khác nhau.