

TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG KHÁNG VI SINH VẬT CỦA MÀNG SINH HỌC PECTIN-ALGINATE VÀ ỨNG DỤNG BẢO QUẢN QUẢ CHANH DÂY (*Passiflora edulis* Sims)

Nguyễn Trọng Thăng*, Nguyễn Thị Thu Nga, Hoàng Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Bích Thủy

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

*Tác giả liên hệ: trongthang6886@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.03.2022

Ngày chấp nhận đăng: 21.10.2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm tăng cường khả năng kháng vi sinh vật của dung dịch tạo màng Pec-Alg. Nanobubbles (NBs), tinh dầu quế (Cinna) và chlorine (Chlo) là 3 chất tiềm năng được lựa chọn để bổ sung vào dung dịch Pec-Alg. Hiệu lực ức chế vi sinh vật được đánh giá ở điều kiện *in vitro*, sau đó phủ màng Pec-Alg trên quả chanh dây để đánh giá hiệu quả kháng vi sinh vật tỉ lệ lây bệnh trong thời gian bảo quản, sự biến đổi chất lượng của quả chanh dây thông qua các chỉ tiêu sinh lý, cơ lý, hóa sinh. Kết quả cho thấy các dung dịch Pec-Alg bổ sung NBs, Cinna, Chlo đều có hiệu lực ức chế vi sinh vật cao trong điều kiện *in vitro*, lần lượt là 86,7%; 74,1% và 93,6%. Hơn nữa, chúng có tác dụng rất tích cực trong việc ức chế vi sinh vật trên quả chanh dây (Pec-Alg-Chlo > Pec-Alg-NBs > Pec-Alg-Cinna). Dung dịch Pec-Alg-Chlo có hiệu lực ức chế vi sinh vật cao nhất đạt 84,4% tại thời điểm 1h sau phủ màng và 43,6% sau 30 ngày bảo quản. Đồng thời, chúng có hiệu quả rõ rệt trong việc hạn chế tỉ lệ lây bệnh, qua đó giúp kéo dài thời gian bảo quản chanh dây đến 33 ngày, nghĩa là tăng thêm 15 ngày so với đối chứng và tăng thêm 9 ngày so với màng Pec-Alg chưa bổ sung chất kháng vi sinh vật.

Từ khóa: Pectin, alginate, màng sinh học, nanobubbles, chlorine, chanh dây.

Enhancing the Antimicrobial Activity of Pectin-Alginate Biofilm and its Application in Preservation of Fresh Passion Fruits (*Passiflora edulis* Sims)

ABSTRACT

The present study was aimed to enhance the antimicrobial activity of Pec-Alg film-forming solution. Nanobubbles (NBs), cinnamon essential oil (Cinna) and chlorine (Chlo) were three potential substances added to Pec-Alg solutions. The microbial inhibitory effect was evaluated *in vitro*, and the Pec-Alg solutions were directly applied to passion fruits to evaluate the antimicrobial effect, the rate of disease transmission during storage, and the quality changes of passion fruit through physiological, mechanical and biochemical parameters. The results showed that the solutions of Pec-Alg supplemented with NBs or Cinna or Chlo all had high inhibitory effect *in vitro* conditions with 86.7%, 74.1% and 93.6%, respectively. Moreover, they had a positive inhibitory effect on microorganisms on passion fruits in the following order: Pec-Alg-Chlo > Pec-Alg-NBs > Pec-Alg-Cinna, of which Pec-Alg-Chlo solution had the highest inhibitory effect, reaching 84.4% at 1 hour after coating and 43.6% after 30 days of storage. They were also significantly effective to limit the rate of disease transmission during storage, contributing to prolong the shelf life of passion fruits up to 33 days, which means an increase of 15 days compared to the control and an increase of 9 days compared to Pec-Alg coating without addition of any antimicrobial agents.

Keywords: Pectin, alginate, nanobubbles, chlorine, biofilm, passion fruits.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong lĩnh vực bảo quản rau quả tươi, các nhà khoa học đã và đang tập trung nghiên cứu tìm kiếm các loại vật liệu sinh học mới. Theo xu

hướng đó, các màng sinh học để bảo quản an toàn thực phẩm ngày càng được tìm ra nhiều hơn như chitosan, gelatin, pectin, tinh bột, carrageenan, alginate, cellulose... Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với chiến lược tăng trưởng

xanh của Việt Nam trong nỗ lực hạn chế ô nhiễm môi trường do bao bì plastic. Màng pectin và alginate đã được một số nghiên cứu ứng dụng có hiệu quả trên các loại trái cây như xoài, hồng xiêm, dâu tây, quả bơ (Silva & cs., 2018; Menezes & cs., 2016; Garza & cs., 2015; Maftoonazad & cs., 2008). Tuy nhiên, các công bố này chưa tập trung nghiên cứu khía cạnh kháng vi sinh vật của màng pectin-alginate trong quá trình bảo quản.

Các nhà khoa học chỉ ra rằng mỗi loại vật liệu sinh học đều có những ưu và nhược điểm nhất định, vì vậy xu hướng hiện nay là nghiên cứu sự kết hợp của ít nhất hai loại vật liệu khác nhau trong dung dịch tạo màng sinh học để hỗ trợ và tăng cường hiệu quả bảo quản của chúng. Màng pectin-alginate (Pec-Alg) được sử dụng trong nghiên cứu này là kết quả của đề tài cấp Học viện năm 2020 (mã số: T2020-08-39). Nghiên cứu đã được thực hiện cho thấy màng phức hợp Pec-Alg tạo ra có hiệu quả kéo dài thời gian bảo quản, đồng thời vẫn duy trì được chất lượng của quả chanh dây. Tuy nhiên, một vấn đề lớn còn tồn tại là tỉ lệ lây bệnh trong quá trình bảo quản vẫn cao. Nguyên nhân là do các vi sinh vật (VSV) gây bệnh sau thu hoạch vẫn chưa được xử lý trước khi đưa vào bảo quản. Vì vậy, đề tài lựa chọn chlorine, tinh dầu quế và nanobubbles để nghiên cứu kết hợp vào dung dịch tạo màng Pec-Alg.

Cơ chế tác động của chlorine là khi clo tác dụng với nước sẽ tạo ra các phân tử axit hypochlorous (HOCl), một hợp chất có năng lực khử trùng rất mạnh. Quá trình tiêu diệt vi sinh vật xảy ra qua hai giai đoạn: đầu tiên HOCl khuếch tán xuyên qua màng tế bào của vi sinh vật, sau đó phản ứng với enzyme bên trong tế bào và phá hoại quá trình trao đổi chất dẫn đến VSV bị tiêu diệt (Odlaug & cs., 1981).

Tinh dầu quế với hoạt chất cinnamaldehyde cũng đã được một số nghiên cứu chứng minh rằng có hiệu quả trong việc tiêu diệt và ức chế sự phát triển của các VSV. Tác dụng kháng nấm của cinnamaldehyde là do nó có tác dụng ức chế enzym tổng hợp tế bào (β -(1,3)-glucan synthase và synthase chitin) do đó làm mất tế bào chất, vỡ màng tế bào, phá hủy ty thể và mất sự ổn

định của thành tế bào nên ảnh hưởng đến hình thái và sự phát triển của nấm (Zhang & cs., 2016; Xing & cs., 2014).

Tác dụng kháng khuẩn của NBs được giải thích là do có kích thước siêu vi (nanometer), NBs dễ dàng thâm nhập vào các lỗ siêu nhỏ trên bề mặt rau quả để loại bỏ bụi bẩn, vi sinh vật và các chất lắng cặn khác mà nước thông thường không thể nào tiếp cận được. Chính nhờ kích thước siêu nhỏ này mà NBs có tính chất vật lý riêng biệt khác hẳn so với những bọt khí kích thước micrometre hoặc lớn hơn (Khan & cs., 2017). Marui & cs. (2013) đã chứng minh các microbubbles và nanobubbles khi bị vỡ ra sẽ phóng thích nhiều gốc tự do, có khả năng diệt khuẩn, sát trùng, khử mùi hôi.

Chanh dây là loại quả có sản lượng và giá trị xuất khẩu ngày càng cao. Theo báo cáo của Cục Trồng trọt (2019), tổng diện tích chanh dây cả nước đến cuối năm 2019 đạt khoảng 10,5 nghìn hecta. Tổng sản lượng quả tươi ước đạt 222,3 nghìn tấn. Thị trường tiêu thụ xuất khẩu chanh dây được mở rộng tới trên 50 nước, chủ yếu là Mỹ, EU, Đài Loan, Hồng Kông và các nước Trung Đông... Trong đó, giá trị gia tăng lớn nhất khi xuất khẩu chanh dây ở dạng quả tươi.

Hiện nay, chanh dây được bảo quản chủ yếu bằng cách xử lý hóa chất chống nấm kết hợp với nhiệt độ thấp và bao gói plastic. Các phương pháp này vừa tốn chi phí cao vừa gây nguy cơ mất an toàn thực phẩm. Do đó, việc nghiên cứu các màng sinh học có khả năng kháng vi sinh vật đang là xu hướng được các nhà khoa học và các doanh nghiệp quan tâm. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là để tăng cường khả năng kháng vi sinh vật của dung dịch tạo màng sinh học Pec-Alg, đồng thời nâng cao hiệu quả bảo quản quả chanh dây.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Dung dịch tạo màng Pec-Alg được chuẩn bị theo công thức phối trộn của Nguyễn Trọng Thăng & cs. (2021). NBs được tạo ra bằng hệ thống thiết bị miniGaLF UFB, model FZ1N-04FB, actini, Nhật Bản. NBs được sử dụng thay thế

cho nước thông thường. Tinh dầu quế độ tinh khiết 97% được pha loãng trước bằng glycerin thực vật, sau đó bổ sung vào DDTM Pec-Alg trong quá trình phối trộn đạt nồng độ 0,6%. Chlorine được bổ sung vào DDTM Pec-Alg đạt nồng độ 120ppm. Pectin có độ tinh khiết 76% thuộc loại LMP được chiết xuất từ vỏ quả chanh dây tía (*Passiflora edulis* Sims) theo quy trình của Ranganna & cs. (2001). Tất cả các hóa chất được sử dụng là hóa chất tinh khiết thương mại có xuất xứ Đức, Ấn Độ, Trung Quốc. Sodium alginate được chiết xuất từ tảo nâu (hãng Zhanyun, Trung Quốc), glycerol nguồn gốc thực vật (hãng Duchefa, Hà Lan).

Quả chanh dây tía (*Passiflora edulis* Sims) trồng tại tỉnh Sơn La được lấy mẫu theo TCVN 5102-90 (ISO 874-1980). Quả được thu hái ở thời điểm 60 ngày sau khi đậu quả (25% diện tích vỏ quả chuyển màu). Sau khi thu hoạch, quả được vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm trong ngày để bố trí thí nghiệm.

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Thử nghiệm khả năng ức chế VSV của các dung dịch tạo màng trong điều kiện *in vitro*

Chuẩn bị dung dịch VSV mật độ 10^6 CFU/ml từ các quả chanh dây bị bệnh. Lần lượt cho 1ml mẫu VSV này vào các ống nghiệm có chứa sẵn 5ml dung dịch tạo màng tương ứng (kí hiệu theo các công thức tạo màng trong mục 2.3; Mật độ VSV dựa trên nghiên cứu của Shaaban & cs. (2017)): nước cất (đối chứng); Pec-Alg; Pec-Alg-NBs; Pec-Alg-Cinna; Pec-Alg-Chlo. Khuấy, lắc đều trong 3 phút. Sau đó tiến hành định lượng VSV trong các mẫu theo TCVN 4884-2:2015 để xác định hiệu lực ức chế VSV của các dung dịch tạo màng (DDTM) trong điều kiện *in vitro*.

2.2.2. Đánh giá hiệu lực ức chế VSV trong điều kiện *in vivo* trên quả chanh dây

Chuẩn bị dịch mẫu vi sinh có mật độ VSV 10^4 CFU/ml từ các quả chanh dây bị bệnh. Sau đó, lây nhiễm nhân tạo bằng cách nhúng tất cả các quả chanh dây thí nghiệm vào dung dịch chứa VSV trên trong 1 phút. Mỗi công thức sử

dụng 150 quả (3 lần lặp lại). Lấy quả ra và để yên trong 24h để dịch VSV thấm và se lại tự nhiên, nghĩa là các VSV có thể bám trên bề mặt quả. Tiến hành lấy mẫu quả chanh dây xác định mật độ VSV để khẳng định lượng VSV sống trên quả. Bước tiếp theo, nhúng các quả chanh dây trong thời gian 3 phút bằng các dung dịch tạo màng theo 5 công thức (CT) sau đây (Nồng độ tinh dầu quế bổ sung 0,6%, nồng độ chlorine bổ sung 120ppm dựa trên nghiên cứu của Basaglia & cs. (2021) và Alicea & cs. (2018)):

C: công thức đối chứng, sử dụng nước cất

M1: dung dịch tạo màng pectin-alginate (Pec-Alg)

M2: dung dịch tạo màng pectin-alginate sử dụng hoàn toàn nước nanobubbles để phối trộn thay cho nước thông thường (Pec-Alg-NBs)

M3: dung dịch tạo màng pectin-alginate bổ sung tinh dầu quế 0,6% (Pec-Alg-Cinna)

M4: dung dịch tạo màng pectin-alginate bổ sung chlorine nồng độ 120ppm (Pec-Alg-Chlo).

Sau khi xử lý 1h, lấy mẫu quả để phân tích định lượng VSV sau xử lý để tính hiệu lực ức chế VSV. Sau đó mẫu được cho vào hộp giấy carton và tiến hành bảo quản chanh dây ở nhiệt độ $6 \pm 1^\circ\text{C}$, độ ẩm 90-95%. Trong quá trình bảo quản, tiếp tục xác định hiệu lực ức chế tại thời điểm 15 ngày, 30 ngày. Đồng thời, theo dõi và phân tích các chỉ tiêu sinh lý, cơ lý, hóa sinh của quả chanh dây định kỳ từ ngày 0 (trước khi xử lý bằng DDTM).

2.2.3. Đánh giá khả năng hạn chế lây bệnh trong quá trình bảo quản chanh dây

Tiến hành phủ màng trên các quả khỏe mạnh theo 5 công thức ở mục trên 2.2.2. Mỗi công thức sử dụng 120 quả (3 lần lặp lại). Sau đó mỗi công thức bố trí 20% số quả bị bệnh đặt vào bảo quản cùng các quả khỏe mạnh đã phủ màng. Theo dõi để xác định tỉ lệ lây bệnh sau khi kết thúc quá trình bảo quản (thời điểm tất cả các mẫu có tỉ lệ tổn thất $\geq 10\%$). Quả bị lây bệnh được tính khi có các triệu chứng sau: xuất hiện những đốm tròn có màu nâu, xung quanh vết bệnh có viền màu xanh xám, vết bệnh hơi lõm xuống hoặc trên quả xuất hiện các giọt dịch màu nâu xung quanh vết bệnh.

Tỉ lệ lây bệnh được tính như sau:

$$T_{lb} = \frac{B}{K} \times 100$$

Trong đó: T_{lb} : tỉ lệ lây bệnh (%); B: số quả khỏe bị nhiễm bệnh sau bảo quản (quả); K: tổng số quả khỏe ban đầu (quả).

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Định lượng vi sinh vật hiếu khí tổng số

Phương pháp định lượng vi sinh vật theo ISO 4833-2:2013 (tương đương TCVN 4884-2:2015) bằng kỹ thuật cấy bề mặt:

$$N(\text{CFU/ml}) = \frac{\sum C}{(n_1 v d_1 + \dots + n_i v d_i)}$$

Trong đó:

N: số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi sinh vật trong 1ml mẫu;

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn (có số khuẩn lạc nằm trong khoảng từ 25-300 khuẩn lạc/đĩa);

n_i : số hộp petri cấy tại độ pha loãng thứ i ;

d_i : hệ số pha loãng tương ứng;

v: thể tích dịch mẫu cấy vào mỗi đĩa (ml).

Hiệu lực ức chế VSV được tính theo công thức Abbott như sau:

$$H = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó:

H (%) là hiệu lực ức chế VSV tính theo %;

C (CFU/ml) là số lượng khuẩn lạc trong công thức đối chứng;

T (CFU/ml) là số lượng khuẩn lạc trong công thức thí nghiệm.

2.3.2. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu sinh lý, cơ lý, hóa sinh của quả chanh dây trong quá trình bảo quản

Cường độ hô hấp và lượng ethylene sản sinh được xác định dựa trên phương pháp của Maftoonazad & Ramaswamy (2008) sử dụng máy đo CO_2 , O_2 Dual gas analyser ICA250, UK và Ethylene analyser ICA56, UK; Tỉ lệ hao hụt

khối lượng tự nhiên của quả được xác định bằng phương pháp cân (độ chính xác 0,01g); Độ cứng của quả được xác định bằng phương pháp không phá mẫu sử dụng thiết bị Mark 10, USA; Sự biến đổi màu sắc vỏ quả (ΔE) được xác định bằng máy đo màu Chromameter CR400, Nhật Bản; Hàm lượng chất khô hoà tan tổng số được xác định theo TCVN 4417-87 sử dụng chiết quang kế kỹ thuật số ATAGO (Atago, Tokyo, Nhật Bản); Hàm lượng axit hữu cơ tổng số được xác định theo TCVN 5483-91 (ISO 750-1981).

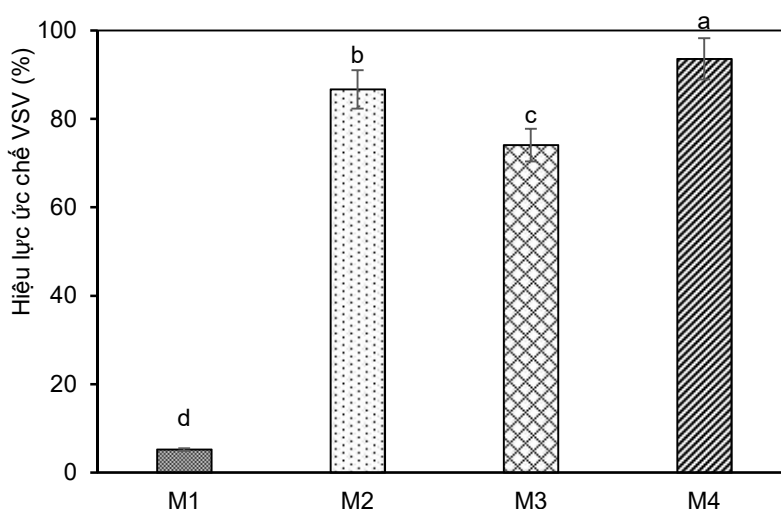
2.4. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của ít nhất ba thí nghiệm lặp lại. Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai ANOVA một nhân tố trên phần mềm Statgraphics Centurion 18. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ phép so sánh Tukey với mức tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

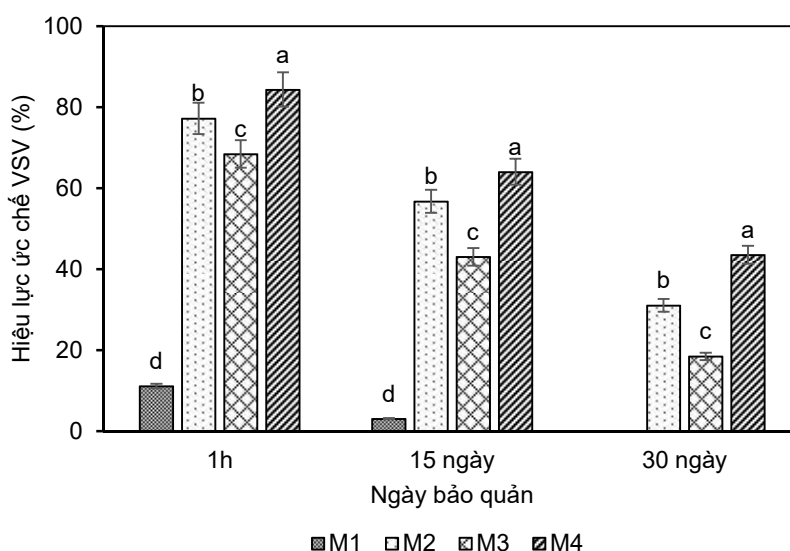
3.1. Đánh giá khả năng ức chế VSV của các dung dịch tạo màng trong điều kiện *in vitro*

Thí nghiệm này nhằm đánh giá hiệu lực ức chế VSV của các DDTM trong điều kiện *in vitro*. Kết quả hình 1 cho thấy cả ba CT thí nghiệm đều có hiệu lực ức chế vượt trội so với CT không bổ sung chất kháng VSV. Cụ thể, 3 DDTM bổ sung NBs, tinh dầu quế, chlorine đều đạt hiệu lực ức chế trên 74%; lần lượt là 86,7%; 74,1% và 93,6%, trong khi đó công thức Pec-Alg chỉ đạt 5,2%. Điều đó chứng tỏ cả ba chất kháng VSV thử nghiệm đều có tiềm năng cao trong việc hạn chế sự phát triển của VSV. Hơn nữa, phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa ba CT bổ sung chất kháng VSV, trong đó DDTM bổ sung chlorine đạt hiệu lực ức chế VSV cao nhất. Điều này cũng dễ hiểu vì chlorine đã được chứng minh là chất có tính sát khuẩn rất mạnh (Odlaug & cs., 1981). Tác dụng kháng VSV của tinh dầu quế và NBs cũng đã lần lượt được khẳng định bởi Zhang & cs. (2016) và Khan & cs. (2017).



Ghi chú: M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; Các cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 1. Hiệu lực ức chế VSV của các DDTM trong điều kiện *in vitro*



Ghi chú: M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; Tại cùng một thời điểm phân tích, các cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 2. Hiệu lực ức chế VSV của các DDTM trên quả chanh dây

3.2. Đánh giá hiệu lực ức chế VSV trong điều kiện *in vivo* trên quả chanh dây

Sau khi lây nhiễm nhân tạo VSV lên tất cả các quả chanh dây, kết quả lưu mẫu kiểm tra có $3,2 \times 10^3$ CFU/g VSV tồn tại trên quả. Tiếp theo, tiến hành nhúng quả trong các DDTM để xác định hiệu lực ức chế VSV. Kết quả được thể hiện trên hình 2.

Kết quả cho thấy tuy hiệu lực ức chế VSV của từng CT thấp hơn so với ở điều kiện *in vitro* tương ứng, nhưng hiệu lực ức chế của các DDTM bổ sung chất kháng VSV đều cao hơn vượt trội so với CT chỉ có Pec-Alg. Thậm chí ở ngày bảo quản thứ 30, đã không thể xác định được hiệu lực ức chế của công thức M1 vì lúc này lượng VSV của M1 đã vượt quá số lượng VSV ban đầu ở CT đối chứng, trong khi ba

DDTM còn lại vẫn đạt hiệu lực ức chế 18,5% (tinh dầu quế), 31,3% (NBs) và cao nhất 43,6% (chlorine). Điều đó chứng tỏ ba DDTM bổ sung chất kháng VSV đã có hiệu quả thực tế trong việc giảm tỉ lệ VSV trên quả chanh dây trong quá trình bảo quản.

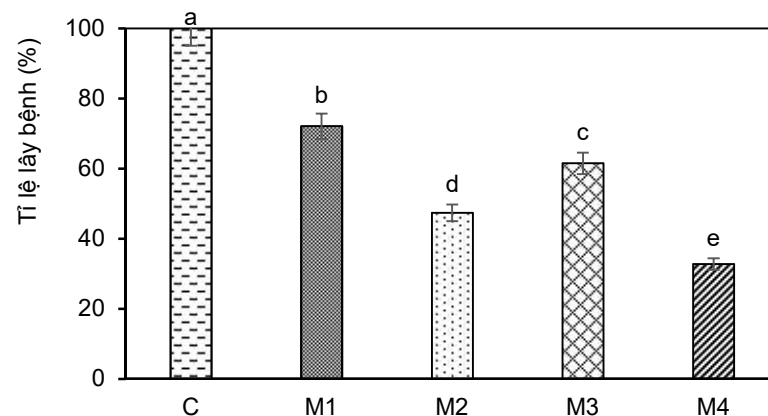
So sánh giữa ba CT bổ sung chất kháng VSV, DDTM bổ sung chlorine luôn có hiệu lực nhỉnh hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), sau đó đến NBs và cuối cùng là tinh dầu quế. Điều này cũng dễ hiểu vì chlorine là một hóa chất có tính sát khuẩn rất mạnh, còn tinh dầu quế là chất có nguồn gốc tự nhiên, NBs có hiệu lực không cao bằng chlorine tuy nhiên nó có ưu điểm rất an toàn cho thực phẩm. Kết quả nghiên cứu của Klintham & cs. (2017) cũng cho thấy khi kết hợp microbubbles với chlorine đã làm giảm mạnh mật độ *S. typhimurium* và *E. coli* (giảm 2-3 log tương đương với 99,2-99,8%).

Thêm vào đó, hiệu lực ức chế VSV của các CT đều giảm theo thời gian bảo quản. Cụ thể, ở thời điểm 1h đầu tiên sau khi nhúng trong các DDTM, hiệu lực ức chế VSV của các CT đều cao hơn so với thời điểm 15 ngày và 30 ngày bảo quản. Nguyên nhân là do khi đó quả chanh dây vừa được nhúng trong các DDTM nên phần lớn các VSV đã bị tiêu diệt, sau đó màng phủ trên bề mặt quả dần dần bị khô lại theo thời gian làm cho chlorine và tinh dầu quế bị bay hơi dần, còn NBs cũng từ từ bị vỡ theo thời gian. Hơn nữa, càng về những ngày bảo quản cuối các VSV còn sống sót càng phát triển mạnh mẽ hơn khi

quả đã dần yếu đi và khả năng bảo vệ của màng phủ cũng suy giảm hơn.

3.3. Đánh giá khả năng hạn chế lây bệnh trong quá trình bảo quản chanh dây

Chỉ tiêu này thể hiện tính năng phòng chống VSV (hạn chế lây bệnh) của các màng phủ. Hình 3 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các CT. Cụ thể, mẫu đối chứng có tỉ lệ lây bệnh cao nhất đạt tới 100%, nghĩa là tất cả các quả khỏe đều bị lây bệnh trong quá trình bảo quản. Trong khi đó chanh dây ở các CT còn lại có tỉ lệ lây bệnh thấp hơn một cách rõ rệt, thấp nhất là CT bổ sung chlorine, chỉ có 32,8% số quả khỏe bị lây bệnh, kế sau là CT bổ sung NBs (47,4%), hai CT còn lại đều có tỉ lệ lây bệnh rất cao ($> 60\%$). Điều này được giải thích rằng tuy clo cũng bị bay hơi dần nhưng nó là chất sát khuẩn có hiệu lực rất mạnh nên chỉ cần một lượng nhỏ nồng độ chlorine còn lại (khoảng vài ppm) cũng đã có tác dụng kháng VSV từ quả bệnh lây nhiễm sang bám trên màng phủ khiến chúng khó xâm nhập và phát triển trên quả. CT đối chứng có tỉ lệ lây bệnh đạt 100% là do quả chanh dây không có bất cứ rào chắn nào để ngăn chặn sự lây nhiễm từ các quả bệnh sang quả khỏe. Điều này chứng tỏ việc phủ màng Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV có hiệu quả rất tích cực trong việc phòng ngừa, ngăn chặn sự lây bệnh giữa các quả chanh dây trong quá trình bảo quản.



Ghi chú: C: đối chứng, M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; Các cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 3. Khả năng hạn chế lây bệnh của các màng phủ trong quá trình bảo quản chanh dây

3.4. Đánh giá sự biến đổi chất lượng của quả chanh dây bảo quản bằng các màng phủ Pec-Alg bổ sung chất kháng vi sinh vật

Kết quả các thí nghiệm ở trên đã cho thấy hiệu quả ức chế và phòng ngừa VSV của các DDTM bổ sung chất kháng VSV. Tuy nhiên, cần thiết đánh giá việc bổ sung các chất kháng VSV này có ảnh hưởng tích cực hay tiêu cực đến sự biến đổi các chỉ tiêu sinh lý, cơ lý, hóa sinh của quả chanh dây trong suốt quá trình bảo quản.

3.4.1. Sự biến đổi các chỉ tiêu sinh lý

Hình 4A cho thấy cường độ hô hấp của quả chanh dây ở các CT đều có xu hướng tăng lên trong những ngày đầu, sau khi đạt đỉnh hô hấp sẽ giảm dần xuống. Tuy nhiên, tốc độ tăng là khác nhau giữa các công thức ($P < 0,05$). Cụ thể, CT đối chứng có tốc độ tăng nhanh nhất với cường độ hô hấp đạt giá trị cao nhất tại ngày thứ 12, tiếp sau đó là CT phủ màng Pec-Alg (ngày thứ 18), ba CT bổ sung chất kháng VSV (ngày thứ 24). Xu hướng biến đổi của ethylene diễn ra tương ứng với quá trình hô hấp (Hình 4B). Điều này là phù hợp vì chanh dây là quả hô hấp đột biến, sinh ra nhiều ethylene trong quá trình chín. Điều đó chứng tỏ màng Pec-Alg bổ sung các chất kháng VSV đều có tác dụng tích cực trong việc kìm hãm quá trình hô hấp và sản sinh ethylene của quả chanh dây.

Hơn nữa, tại tất cả các thời điểm phân tích, chanh dây ở các CT phủ màng đều có cường độ hô hấp và lượng ethylene thấp hơn hẳn so với CT đối chứng. Nguyên nhân là do màng Pec-Alg đã làm cản trở sự thẩm khí O_2 vào bên trong và giảm sự thoát khí CO_2 ra bên ngoài quả. Mà chính môi trường có nồng độ O_2 thấp và CO_2 cao có tác dụng hiệp đồng trong việc ngăn cản sự sinh tổng hợp ethylene (Maftoonazad & cs., 2019). Khả năng kiểm soát hô hấp và sản sinh ethylene của một số loại màng pectin cũng đã được chứng minh có hiệu quả trong bảo quản các loại quả khác như quả xoài, dưa chuột (Moalemiyan & cs., 2012); dâu tây (Abdi & cs., 2017; Garza & cs., 2015).

Đồng thời, cường độ hô hấp của quả chanh dây còn phụ thuộc vào lượng VSV tồn tại trên nó. Nếu có số lượng VSV lớn hoạt động sẽ làm cho

quả có phản ứng hô hấp mạnh hơn để tăng cường sức đề kháng và kích hoạt khả năng tự bảo vệ (Espitia & cs., 2014). Đó chính là lý do cường độ hô hấp ở ba CT bổ sung chất kháng VSV đều thấp hơn và chậm hơn một cách rõ ràng so với CT phủ màng không bổ sung chất kháng VSV.

Tuy nhiên, so sánh giữa ba CT bổ sung chất kháng VSV cho thấy cường độ hô hấp và sự sản sinh ethylene của quả chanh dây không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Điều đó chứng tỏ cả NBs, tinh dầu quế và chlorine đều không ảnh hưởng trực tiếp đến quy luật hô hấp của quả chanh dây, mà chỉ ảnh hưởng gián tiếp thông qua hiệu lực ức chế VSV.

3.4.2. Sự biến đổi các chỉ tiêu cơ lý

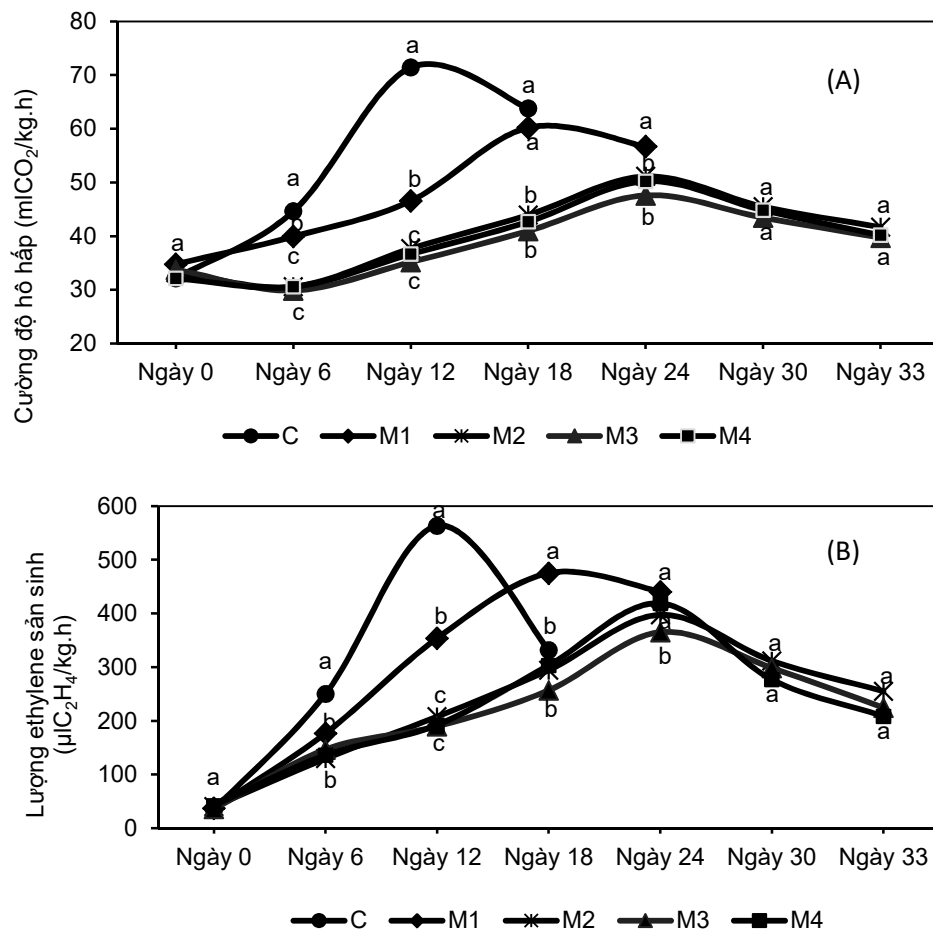
Hình 5A cho thấy ở thời điểm đầu không có sự khác biệt về độ cứng giữa các CT. Sau đó, độ cứng của cả năm CT đều giảm xuống, tuy nhiên ba CT bổ sung chất kháng VSV có tốc độ giảm chậm hơn hẳn so với CT đối chứng. Điều này được giải thích rằng sự biến đổi độ cứng của quả tương ứng với quá trình chín hoặc thối hỏng, quả càng có tốc độ chín nhanh độ cứng càng giảm mạnh và ngược lại. Thêm vào đó, sự thoát hơi nước cũng là nguyên nhân làm cho quả bị giảm độ cứng. Màng Pec-Alg đã được chứng minh có khả năng ngăn cản sự thẩm hơi nước tốt hơn hẳn, do đó góp phần duy trì độ cứng của quả chanh dây (Nguyễn Trọng Thăng & cs., 2021). Kết quả phân tích thống kê cũng chỉ ra rằng độ cứng của chanh dây ở ba CT phủ màng bổ sung chất kháng VSV cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Nhìn chung sự biến đổi màu sắc vỏ quả (chỉ số ΔE) đều có xu hướng tăng lên trong quá trình bảo quản ở tất cả các CT (tăng nhanh thời gian đầu và có xu hướng tăng nhẹ về sau - hình 5B). Mặt khác, tại từng thời điểm phân tích, chỉ số ΔE của ba CT bổ sung chất kháng VSV luôn nhỏ hơn so với hai CT còn lại một cách có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Điều đó chứng tỏ rằng vỏ quả chanh dây ở ba CT này chậm biến đổi màu sắc hơn tương ứng với quá trình chín hoặc thối hỏng diễn ra chậm hơn. Đây là một đặc điểm có lợi cho giá trị cảm quan của quả chanh dây trong quá trình bảo quản.

Tổn thất khối lượng ở tất cả các CT đều có chiều hướng tăng lên theo thời gian bảo quản (Hình 5C). Quá trình thoát hơi nước là nguyên nhân chính làm giảm khối lượng tự nhiên của quả. Quả chanh dây có hàm lượng nước cao nên quá trình sinh lý xảy ra rất nhanh và mạnh, làm tiêu tốn nhiều chất dinh dưỡng và sinh nhiệt nhiều hơn. Sự hao hụt khối lượng tự nhiên của chanh dây ở ba CT bổ sung chất kháng VSV đều thấp hơn đáng kể so với hai CT còn lại tại tất cả các thời điểm đánh giá. Nguyên nhân là do cường độ hô hấp của ba CT đã được kìm hãm một cách rõ rệt như kết quả đã trình bày ở trên. Thêm vào đó, màng Pec-Alg đã được chọn lọc với tính năng ngăn cản sự thẩm hơi nước hiệu quả (Nguyễn Trọng Thăng & cs., 2021).

3.4.3. Sự biến đổi các chỉ tiêu hóa sinh

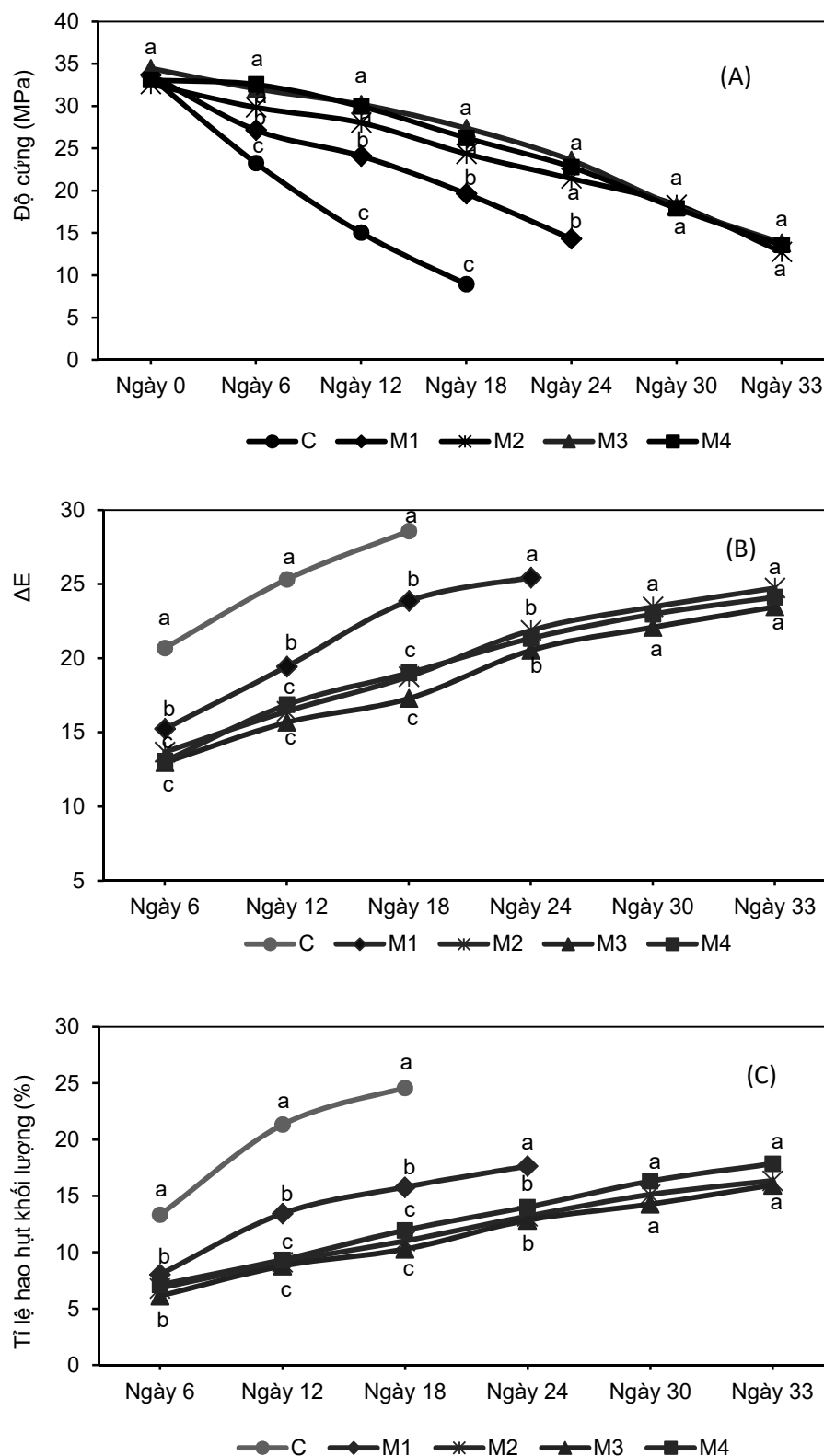
Một cách tổng quát, hàm lượng chất khô hòa tan tổng số của các CT đều có xu hướng tăng nhẹ trong 6 ngày đầu, sau đó giảm dần (Hình 6A). Còn chỉ tiêu axit hữu cơ giảm dần trong quá trình bảo quản. Tuy nhiên tốc độ giảm của ba CT bổ sung chất kháng VSV chậm hơn hẳn so với hai CT còn lại, nghĩa là ba CT này giữ được hàm lượng TSS và axit hữu cơ cao hơn cho đến những ngày bảo quản cuối cùng. Nguyên nhân là do các màng Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV có tác dụng làm giảm cường độ hô hấp và các hoạt động sinh lý của quả chanh dây (như đã trình bày ở trên), từ đó làm giảm lượng chất khô tiêu tốn. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Yimenu & cs. (2017) trên quả cam; Menezes & Athmaselvi (2016) trên quả hồng xiêm; Maftoonazad & cs. (2019) trên quả chanh vàng.



Ghi chú: C: đối chứng, M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; (A): Cường độ hô hấp; (B): Sự sản sinh ethylene.

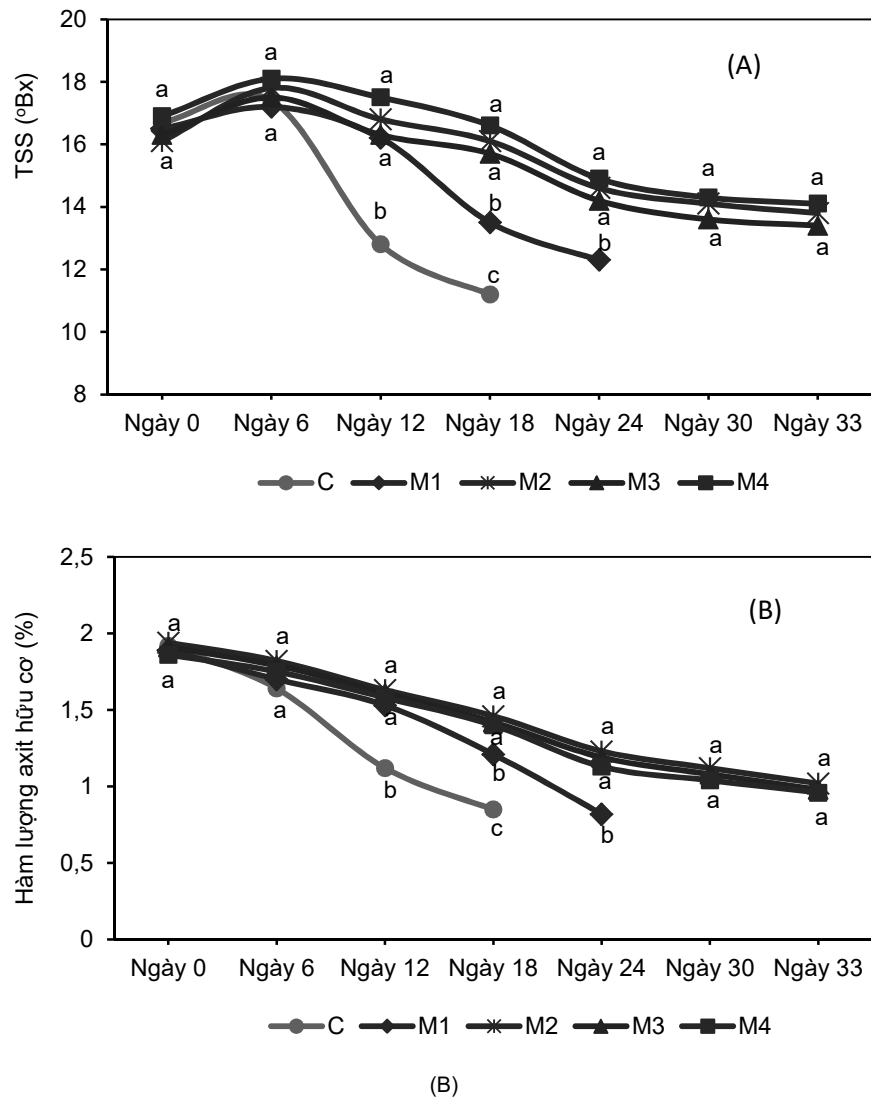
Hình 4. Sự biến đổi các chỉ tiêu sinh lý của quả chanh dây trong quá trình bảo quản

Tăng cường khả năng kháng vi sinh vật của màng sinh học pectin-alginate và ứng dụng bảo quản quả chanh dây (*Passiflora edulis* Sims)



Ghi chú: C: đối chứng, M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; (A): Độ cứng; (B): Màu sắc vỏ quả; (C): Tỷ lệ hao hụt khối lượng.

Hình 5. Sự biến đổi các chỉ tiêu cơ lý của chanh dây trong quá trình bảo quản



Ghi chú: C: đối chứng, M1: Pec-Alg, M2: Pec-Alg-NBs, M3: Pec-Alg-Cinna, M4: Pec-Alg-Chlo; (A): Chất khô hòa tan tổng số; (B): Axit hữu cơ.

Hình 6. Sự biến đổi các chỉ tiêu hóa sinh của quả chanh dây trong quá trình bảo quản

3.4.4. Thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản của quả chanh dây được xác định dựa trên tất cả các chỉ tiêu đã được đánh giá ở trên và giá trị sử dụng của quả. Kết quả là CT đối chứng chỉ bảo quản chanh dây tươi được 18 ngày, CT phủ màng Pec-Alg bảo quản chanh dây được 24 ngày, trong khi ba CT phủ màng Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV có thể kéo dài thời gian bảo quản lên đến 33 ngày, nghĩa là tăng thêm 15 ngày so với CT đối chứng và tăng thêm 9 ngày so với màng Pec-Alg chưa bổ sung chất kháng VSV.

4. KẾT LUẬN

Các dung dịch tạo màng Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV (NBs, tinh dầu quế, chlorine) đều có hiệu lực ức chế VSV cao trong điều kiện *in vitro* và có tác dụng tích cực trong việc ức chế VSV trên quả chanh dây. Dung dịch tạo màng Pec-Alg-Chlo có hiệu lực ức chế VSV cao nhất đạt 84,4% tại thời điểm 1h sau phủ màng và 43,6% sau 30 ngày bảo quản. Các màng phủ Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV có hiệu quả rõ rệt trong việc hạn chế tỉ lệ lây bệnh trong quá trình bảo quản chanh dây. Màng Pec-Alg-Chlo

có tỉ lệ lây bệnh thấp nhất (32,8%) sau 33 ngày bảo quản. Các màng Pec-Alg bổ sung chất kháng VSV giúp kéo dài thời gian bảo quản chanh dây lên đến 33 ngày. Để tăng cường khả năng kháng VSV và nâng cao hiệu quả bảo quản của màng Pec-Alg nên bổ sung chất kháng VSV là chlorine nồng độ 120ppm. Bên cạnh đó, NBs cũng là một lựa chọn rất tiềm năng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdi S., Rooein Z., Erfanimoghadam J. & Aziznia S. (2017). Application of pectin coating containing essential oil for increasing quality of strawberry fruit. *Journal of Postharvest Technology*. 5: 83-94.
- Alicea C., Annous B.A., Mendes D.P., Burke A. & Orellana L.E. (2018). Evaluation of hot water, gaseous chlorine dioxide, and chlorine treatments in combination with an edible coating for enhancing safety, quality, and shelf life of fresh-cut cantaloupes. *Journal of Food Protection*. 81(4): 534-541.
- Basaglia R.R., Pizato S., Santiago N.G., Almeida M., Pinedo R.A. & Cortez-Vega W.R. (2021). Effect of edible chitosan and cinnamon essential oil coatings on the shelf life of minimally processed pineapple (*Smooth cayenne*). *Food Bioscience*. 41: 100966
- Bộ NN&PTNT (2019). Báo cáo thống kê của Cục trồng trọt. Hội nghị thúc đẩy phát triển sản xuất chanh leo bền vững.
- Espitia P.J.P., Du W.X., Soares N.F.F. & McHugh T.H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - a review. *Food Hydrocolloids*. 35: 287-296.
- Garza T., Garcia S., Gonzalez S.F. & Nino A.K. (2015). Edible active coatings based on pectin, pullulan and chitosan increase quality and shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Science*. 80: 1823-1830.
- Huber D.J. (1983). The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews*. 5: 169-219.
- Khan P., Zhu W., Huang F. & Gao W. (2020). Micro-nanobubble technology and water-related application. *Water Supply*. 20(6): 2021-2035.
- Klintham P., Tongchitpakdee S. & Chinsirikul W. (2017). Combination of microbubbles with oxidizing sanitizers to eliminate *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* on Thai leafy vegetables. *Food Control*. 77: 260-269
- Maftoonazad N. & Ramaswamy H. (2008). Effect of pectin-based coating on the kinetics of quality change associated with stored avocados. *Journal of Food Process Preservation*. 32: 621-643.
- Maftoonazad N. & Ramaswamy H. (2019). Application and evaluation of a pectin-based edible coating process for quality change kinetics and shelf-life extension of lime fruit (*Citrus aurantifolium*). *Coatings*. 9(5): 285.
- Marui T. (2013). An introduction to micro/nano-bubbles and their applications. *Journal of Systemics*. 11(4): 68-73.
- Menezes J. & Athmaselvi K. (2016). Study on effect of pectin based edible coating on the shelf life of sapota fruits. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 13(2): 1195-1199.
- Moalemiyan M., Ramaswamy H. & Maftoonazad N. (2012). Pectin-based edible coating for shelf-life extension of ataulfo mango. *Journal of Food Process Engineering*. 35: 572-600.
- Nguyễn Trọng Thắng, Nguyễn Thị Bích Thủy & Hoàng Thị Minh Nguyệt (2021). Nghiên cứu chế tạo màng sinh học pectin-alginate sử dụng pectin từ vỏ quả chanh dây tía (*Passiflora edulis* Sims) và ứng dụng trong bảo quản chanh dây. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 19(6): 840-851
- Odlaug E.T. (1981). Antimicrobial Activity of Halogens. *Journal of Food Protection*. 44 (8): 608-613.
- Ranganna S. (2001). Pectin: handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products. Tata McGraw-Hill Publishing, USA. pp. 31-47.
- Shaaban H.A., Ali H.S., Bareth G.F., Al-khalifa A.R.S. & Amer M.M. (2017). Antimicrobial activity of two polysaccharide edible films incorporated with essential oils against three pathogenic bacteria. *Journal of Applied Sciences*. 17(4): 171-183.
- Silva F.A., Finkler L. & Finkler C.L. (2018). Effect of edible coatings based on alginate/pectin on quality preservation of minimally processed 'Espada' mangoes. *Journal of Food Scientists & Technologists*. 55(12): 5055-5063.
- Xing F., Hua H., Selvaraj J.N., Zhao Y., Zhou L. & Liu X. (2014). Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*. 46: 343-350. 10.1016/j.foodcont.2014.04.037.
- Yimenu S.M., Abera S. & Solomon W. (2017). Effect of bee wax and linseed oil coatings and frequency of dipping on the biochemical and organoleptic quality of fresh orange juice (*Citrus sinensis* cv. Valencia). *Journal of Postharvest Technology*. 5: 17-28.
- Zhang Y.B., Liu X.Y., Wang Y.F., Jiang P.P. & Quek S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 59: 282-289. 10.1016/j.foodcont.2015.05.032.