

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN
CỦA CÁC CHẾ PHẨM TỪ TỎI (ALLIUM SATIVUM)
NHẪM ỨNG DỤNG ĐỂ BẢO QUẢN THỰC PHẨM
STUDY ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF GARLIC PRODUCTS
FOR USING THE GARLIC AS FOOD PRESERVATIVE**

Hoàng Đình Hòa, Phan Thanh Tâm, Phạm Thị Thu Hiền
Viện Công nghệ Sinh học và CN Thực phẩm, Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Ba chế phẩm từ tỏi là dịch chiết tỏi tươi (Aqueous Garlic Extract-AGE), bột tỏi (Garlic Powder-GP) và dầu tỏi (Garlic Oil-GO) có chứa các hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật đặc biệt là các vi sinh vật gây bệnh sinh độc tố hay gặp trong thực phẩm như *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*..., và cả hai loại nấm men gây hại sinh nhầy nhớt được phân lập từ nem chua. Sự nhạy cảm của một số chủng vi khuẩn lactic có lợi đối với các hợp chất kháng khuẩn này cũng đã được xác định. Giá trị MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) - Nồng độ ức chế tối thiểu đã được xác định cho cả ba loại chế phẩm tỏi trên đối với các loại vi sinh vật chỉ thị trên. Kết quả cho thấy khả năng kháng các vi sinh vật chỉ thị của các chế phẩm tỏi là rất cao, giá trị MIC biến thiên đối với AGE là 7,8÷62,5mg/ml, GP là 1,76÷13,9mg/ml và với GO là 0,1÷1,2mg/ml. Độ bền của các hợp chất kháng khuẩn này ở các điều kiện bảo quản khác nhau cũng đã được nghiên cứu. Động học sinh trưởng của các vi sinh vật chỉ thị khi bổ sung vào môi trường các chế phẩm tỏi cho thấy ngay từ ban đầu cho đến 24-30h có sự ức chế hầu như hoàn toàn quá trình phát triển của chúng. Kết quả nghiên cứu mở ra triển vọng ứng dụng tỏi như một chất bảo quản thực phẩm an toàn trong các sản phẩm thực phẩm mà tỏi được sử dụng như một gia vị.

ABSTRACT

The three garlic products are: Aqueous Garlic Extract (AGE), Garlic Powder (GP) and Garlic Oil (GO) which contain various antimicrobial substances that can inhibit some microorganism including food pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*..., and harmful yeast isolated from nem chua. The sensitivity of some useful lactic acid bacteria by three garlic products was studied. MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) of three garlic products to these indicator microbials were determined. The result showed that the inhibition activity of these products to indicator microbials were very high, MIC of AGE are 7,8 to 62,5 mg/ml, MIC of GP are 1,76 to 13,9 mg/ml and MIC of GO are, 0,1 to 1,2 mg/ml. The durability of garlic products in different preserving conditions were studied. The growth of indicator microbials in the media supplemented garlic products were inhibited mostly at the initial to 24-30h of growing. The results open prospects of applying garlic as safe food preservation substance in food products that use garlic as a spices.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỏi có tên khoa học là *Allium sativum* từ lâu không những là một loại gia vị phổ biến mà còn chứa một lượng lớn các hợp chất kháng khuẩn vô cùng quý báu. Bản chất của các hợp chất này là các hợp chất

sunfur (chiếm 1,1-3,5%) trong thành phần tỏi, cao nhất trong các loại cây cỏ [1]. Trong củ tỏi tươi nguyên vẹn mới chỉ có các tiền các hợp chất kháng khuẩn (cystein sulfoxide), còn trong tép tỏi đã nghiền khi mà các enzym alliinaza tác dụng để tạo thành các hợp chất thiosulfinates mà chủ

yếu là allicin có tính kháng khuẩn cao nhưng không bền ở nhiệt độ thường. Trong thành phần bột tỏi ngoài các hợp chất thiosulfinates còn có thêm một số hợp chất alkenyl polysulfides nên hoạt tính kháng vi sinh vật của bột tỏi thường bền và cao hơn tỏi tươi, còn trong thành phần dầu tỏi chủ yếu là các hợp chất alkenyl polysulfides nên hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm này rất mạnh và bền.

Hiện nay nguy cơ ô nhiễm các vi sinh vật gây bệnh sinh độc tố trong thực phẩm là rất cao nên việc nghiên cứu tìm ra các chế phẩm có nguồn gốc từ thực vật có khả năng kháng khuẩn cao để sử dụng như một chất bảo quản thực phẩm là vô cùng cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

- Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* K12TG1 (ĐH Enspana-Pháp); *Listeria monocytogenes* (ĐH Tolus, Pháp); *Bacillus cereus* ATCC 10876; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Salmonella typhimurium* (Viện vệ sinh dịch tễ TW); nấm men LD4.2 và TX4.2 sinh nhầy nhớt và *Lactobacillus plantarum* H1.40, phân lập từ nem chua VN.

- Tỏi: là loại củ to, trắng mua tại ST Metro Hà Nội.

- Môi trường nghiên cứu:

MPA: Cao thịt 3g, pepton 10g, NaCl 5g, thạch 20g - nuôi cấy các vi khuẩn chỉ thị.

MRS: Cao thịt 10g, Pepton 15g, CH₃COONa 5g, Glucoza 20, (NH₄)₃C₆H₅O₇ 2g, MgSO₄.7H₂O 2g, MnSO₄.4H₂O 0,04g, Tween 80 1ml - nuôi cấy vi khuẩn lactic.

OGYA: Cao nấm men 5g, glucoza 10g, gentamicin 0,05g/l - nuôi cấy nấm men, mốc.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp chuẩn bị dịch chiết tỏi AGE: 100g tỏi đã bóc vỏ được đồng hóa với 100ml nước cất vô trùng trong máy khuấy trộn khoảng 2 phút thì đem lọc sơ bộ qua lưới lọc để loại bỏ phần rắn. Dịch thu được đưa đi lọc vô trùng qua lưới lọc vô trùng có đường kính 0,22μm. Lượng dịch chiết tỏi thu được khoảng 55 ml cho vào

các lọ thủy tinh đã tiệt trùng và đem đi bảo quản ở nhiệt độ cần nghiên cứu (thời gian thu hồi AGE <30 phút).

- Phương pháp chuẩn bị GP: Tỏi bóc vỏ được thái thành các lát nhỏ có độ dày khoảng 1mm rồi đem đi sấy khô bằng quạt thổi không khí nóng ở khoảng nhiệt độ 45 ÷ 50°C đến khi bề mặt thấy giòn và đưa đi xác định độ ẩm đạt < 7% là được sau đó đem đi xay mịn và đem đi bảo quản ở nhiệt độ thường đến khi sử dụng.

- Phương pháp chuẩn bị GO: 80g tỏi tươi bóc sạch vỏ rồi đem đi xay nhỏ với 160ml nước cất, sau đó đưa dịch vào bình cầu của bộ chưng cất tinh dầu nặng (cát lõi cuốn nước). Thời gian cất khoảng 4-5 giờ, chờ cho có sự phân lớp ổn định rồi từ từ chiết dầu ra khỏi pha dầu nước ta thu được tinh dầu tỏi.

- Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC): Dung dịch kiểm định hoạt tính kháng khuẩn được pha loãng theo cấp số hai (1; 1/2, 1/2², 1/2³...; 1/2ⁿ). Vi sinh vật chỉ thị được cấy với mật độ ban đầu là 10⁴ tế bào/ml. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ pha loãng nhỏ nhất mà tại đó ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật kiểm định (dịch nuôi cấy trong suốt quan sát bằng mắt thường) sau 30 - 48 giờ nuôi cấy ở 30 °C.

- Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn: Sử dụng phương pháp khuếch tán trong thạch (agar diffusion)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chế phẩm tỏi

3.1.1 Hoạt tính kháng vi sinh vật và độ bền hoạt tính của AGE

Dịch chiết tỏi tươi được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ thường, 4°C và -20°C. MIC với các vi sinh vật chỉ thị được xác định tại các thời điểm bảo quản là 0, 10, 20, và 30 ngày, kết quả thể hiện ở bảng 3.1. Hoạt tính kháng lại các chủng nấm men và vi sinh vật gây bệnh của AGE rất mạnh, MIC rất nhỏ biến thiên từ 7,8÷15,6 mg/ml. MIC của AGE đối với vi khuẩn lactic *L. plantarum* H1.40 lại cao hơn nhiều lần các vi sinh vật khác (62,5mg/ml), như vậy các chủng lactic rất ít

Bảng 3.1: Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (mg*/ml) của dịch chiết nước tỏi tươi (AGE) đối với các chủng vi sinh vật chỉ thị (mật độ tế bào là 10⁸ tb/ml)

Vi sinh vật chỉ thị	Thời gian bảo quản (ngày)		10			20			30		
	0	1	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Escherichia coli</i>	15,6	31,3	22,1	15,6	62,5	31,3	15,6	500	62,5	62,5	
<i>Bacillus cereus</i>	15,6	62,5	23,4	15,6	250	62,5	31,3	500	62,5	62,5	
<i>Listeria monocytogenes</i>	15,6	125	23,4	15,6	500	31,25	31,25	1000	62,5	62,5	
<i>Salmonella typhimurium</i>	15,6	125	15,6	15,6	250	31,3	31,3	1000	46,9	41,2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,6	62,5	31,3	15,6	250	61,3	31,3	500	46,9	41,2	
Nấm men LD4.2	7,8	44,2	15,6	7,8	62,5	15,6	7,8	500	31,3	7,8	
Nấm men TX 4.2	7,8	31,3	15,6	7,8	62,5	15,6	15,6	500	15,6	15,6	
<i>Lactobacillus plantarum</i> HI.40	62,5	250	88,3	62,5	500	125	62,5	>500	125	125	

Trong đó I : AGE bảo quản ở nhiệt độ thường; II : AGE bảo quản ở 4°C; III : AGE bảo quản ở -20°C
*: tính theo mg tỏi tươi/ml

nhạy cảm với tỏi. Kết quả này có ý nghĩa rất lớn khi sử dụng tỏi làm chất bảo quản sản phẩm lên men. Kết quả bảng 3.1 cũng cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật của AGE ổn định ở nhiệt độ thấp -20°C và giảm mạnh ở nhiệt độ thường.

3.1.2 Hoạt tính kháng vi sinh vật của bột tỏi

Hoạt tính kháng khuẩn của bột tỏi được xác định tại các thời điểm bảo quản là 0, 1, 2, 3, 4 tháng ở nhiệt độ thường được thể hiện ở bảng 3.2

Bảng 3.2: Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (mg/ml) của bột tỏi đối với các vi sinh vật chỉ thị có mật độ tế bào 10⁸ tế bào/ml

Thời gian bảo quản (Tháng)	0	1	2	3	4
<i>Escherichia coli</i>	3.47	3.47	3.47	3.47	6.95
<i>Bacillus cereus</i>	3.47	3.47	3.47	6.95	6.95
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.47	3.47	3.47	6.95	6.95
<i>Salmonella typhimurium</i>	3.47	3.47	3.47	6.95	6.95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.47	3.47	3.47	6.95	6.95
Nấm men LD4.2	3.47	3.47	3.86	6.95	6.95
Nấm men TX 4.2	1.76	1.76	1.76	6.95	6.95
<i>Lactobacillus plantarum</i> HI.40	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9

Kết quả cho thấy khả năng ức chế các chủng vi sinh vật chỉ thị của bột tỏi đều rất cao và cao hơn nhiều dịch chiết tỏi tươi

(AGE).

Nhưng cũng giống dịch chiết tỏi tươi, bột tỏi ức chế lên chùng lactic có lợi là kém nhất điều đó rất có ý nghĩa khi bột tỏi được sử dụng như một chất bảo quản thực phẩm trong các sản phẩm lên men. Thêm vào đó bột tỏi có hàm ẩm thấp và chính vì vậy hoạt tính kháng khuẩn của nó hầu như không thay đổi trong 4 tháng ở nhiệt độ thường.

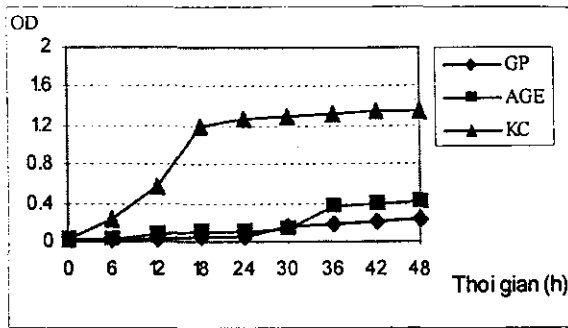
3.1.3 Hoạt tính kháng vi sinh vật của dầu tỏi

Bảng 3.3: Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (mg/ml) của dầu tỏi đối với các chủng vi sinh vật chỉ thị (mật độ 10⁸ tế bào/ml)

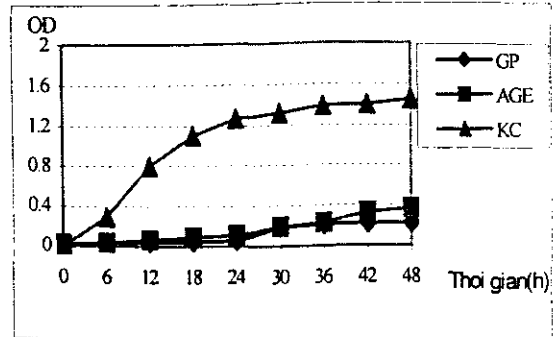
Vi sinh vật chỉ thị	MIC (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	0,4
<i>Bacillus cereus</i>	0,2
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7
Nấm men LD4.2	0,1
Nấm men TX 4.2	0,15
<i>Lactobacillus plantarum</i> HI.40	1,2

Kết quả trên cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của dầu tỏi cao hơn hẳn hai chế phẩm trước. Điều này cũng dễ lý giải bởi trong dầu tỏi hoàn toàn chỉ chứa các hợp chất alkenyl polysulfides (đây là sản phẩm chuyển hóa cuối cùng của các thiosulfinate bởi tác dụng của nhiệt độ nên có hoạt tính cao và bền).

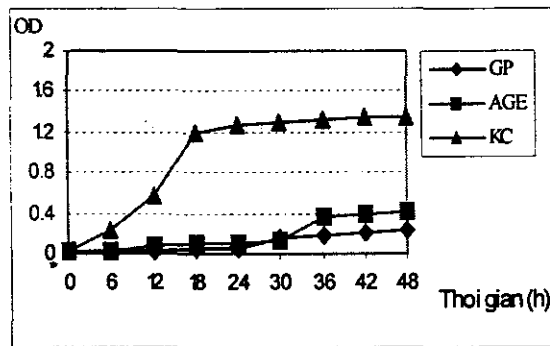
Ghi chú: Ký hiệu GP, AGE - môi trường bổ sung bột tòi, dịch chiết tòi tươi tại MIC;
 KC: kiểm chứng (môi trường không bổ sung các chế phẩm tòi)



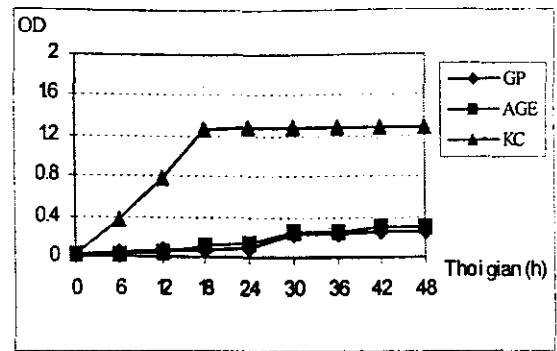
Hình 1: Động học sinh trưởng *Sal. typhimurium* trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



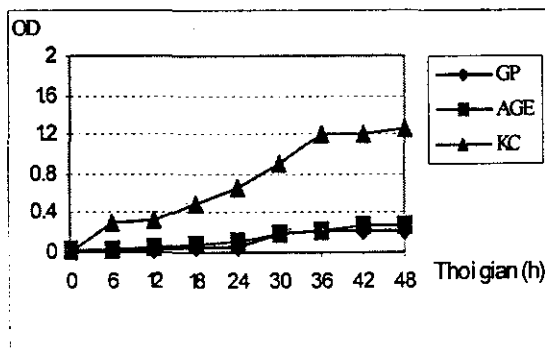
Hình 5: Động học sinh trưởng *B. cereus* trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



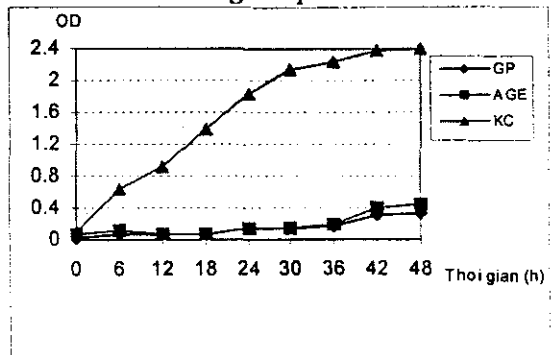
Hình 2: Động học sinh trưởng *E. coli* trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



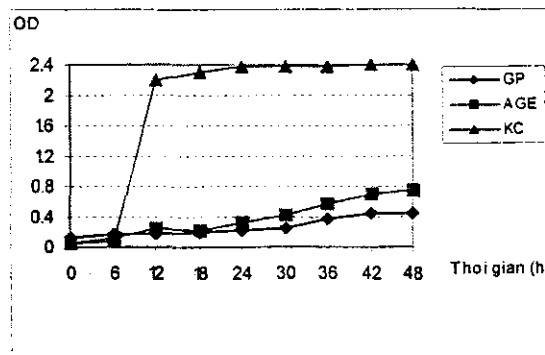
Hình 6: Động học sinh trưởng *St. aureus* trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



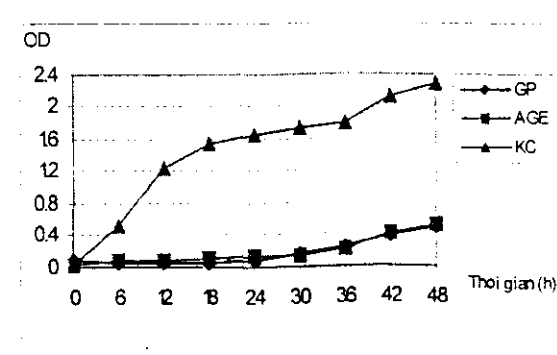
Hình 3: Động học sinh trưởng *L. monocytogenes* trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



Hình 7: Động học sinh trưởng nấm men LD4.2 trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



Hình 4: Động học sinh trưởng *L. plantarum* HI.40 trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi



Hình 8: Động học sinh trưởng nấm men TX4.2 trong các MT có bổ sung chế phẩm tòi

Như vậy đối với cả ba chế phẩm tỏi vi khuẩn lactic đều ít nhạy cảm hơn so với các vi khuẩn gây bệnh sinh độc tố, điều này có ý nghĩa rất lớn và có thể được giải thích do hai nguyên nhân:

+ Các loài vi sinh vật khác biệt nhau ở hàm lượng lipid trong các màng tế bào của chúng, do vậy dẫn đến độ thâm thấu qua màng khác nhau đối với allicin và các thành phần kháng khuẩn của tỏi.

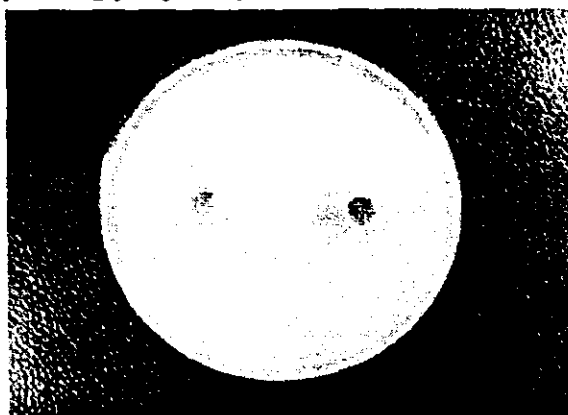
+ Cơ chế tác dụng chính của các thành phần kháng khuẩn của tỏi lên tế bào vi sinh vật là các hợp chất sulfur có trong tỏi có chứa các liên kết -S-S-S-, -S-S- (có trong các hợp chất alkenyl sulfides); -S(=O)-S- (có trong các hợp chất thiosulfonates) phản ứng với nhóm sulfhydryl trong các axit amin cystein của các enzyme có chứa nhóm SH làm vô hoạt chúng mà các enzym này tham gia vào các quá trình tổng hợp ADN và đặc biệt là ARN của tế bào tức là ảnh hưởng đến quá trình tái tạo tế bào của vi sinh vật. Tốc độ phản ứng này lại bị ảnh hưởng rất nhiều của pH, cao nhất ở pH = 8 và chậm hơn rất nhiều lần với pH = 5. Đối với nhóm vi khuẩn lactic trong quá trình phát triển và chuyển hoá đường thành axit lactic nên làm giảm pH của môi trường xuống thấp chính vì vậy sẽ hạn chế phản ứng trên và làm giảm khả năng ức chế của các hợp chất kháng khuẩn của tỏi so với các vi sinh vật khác [1].

3.2 Động học sinh trưởng của các chủng vi sinh vật chỉ thị trong môi trường có bổ sung các chế phẩm tỏi (tại giá trị MIC)

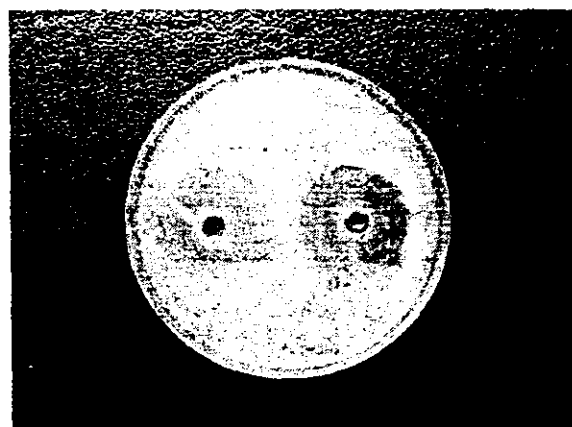
Để theo dõi quá trình ức chế của các chế phẩm tỏi lên sự phát triển của các chủng vi sinh vật chỉ thị chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng sinh trưởng của các vi sinh vật chỉ thị này trong các môi trường lỏng có và không bổ sung các chế phẩm tỏi tại giá trị MIC. Kết quả đo OD (λ 600 nm) của các vi sinh vật chỉ thị được thể hiện trên các hình từ Hình 1- Hình 8. Kết quả cho thấy tại các giá trị MIC thì hầu hết các vi sinh vật chỉ thị đều bị ức chế gần như hoàn toàn ngay từ thời điểm ban đầu cho đến 24-30 h

nuôi cấy so với mẫu không bổ sung, đối với bột tỏi sự ức chế tốt hơn so với dịch chiết tỏi tươi.

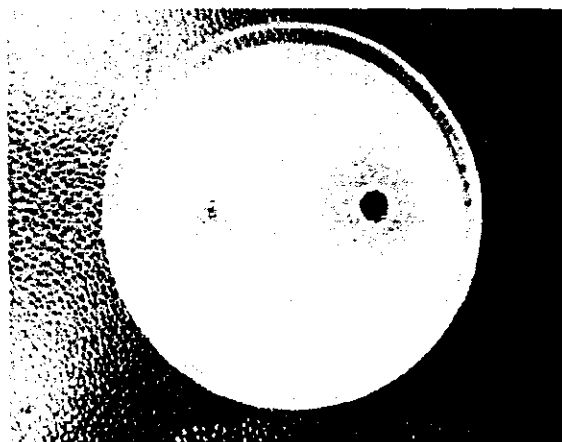
3.3 Một số hình ảnh về sự ức chế vi sinh vật của các chế phẩm tỏi bằng phương pháp khuếch tán thạch



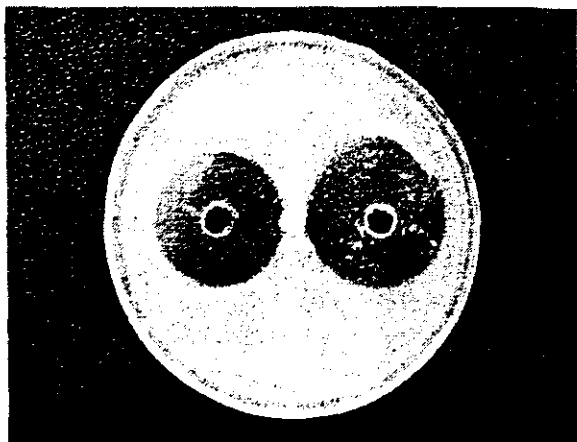
Hình 9: Vùng ức chế của bột tỏi đối với *L. monocytogenes*



Hình 10: Vùng ức chế của bột tỏi đối với *E. coli*



Hình 11: Vùng ức chế của bột tỏi đối với *Sal. typhimurium*



Hình 12: Vùng ức chế của bột tỏi đối với nấm men LD4.2

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của ba dạng chế phẩm từ tỏi là dịch chiết tỏi tươi, bột tỏi ($W = 6,8\%$), dầu tỏi và tìm ra được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chế phẩm này với các vi sinh vật gây bệnh, sinh độc tố hay gặp trong thực phẩm như *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* và hai loại nấm men gây hại được phân lập từ nem chua (LD4.2 và TX4.2) cũng như với một loại vi khuẩn lactic có lợi (*L. plantarum* H1.40). kết quả đối với AGE là ($7,8 \div 62,5$ mg/ml); GP ($1,76 \div 13,9$ mg/ml); GO ($0,1 \div 1,2$ mg/ml).

Đã theo dõi động học sinh trưởng của các vi sinh vật chỉ thị khi bổ sung các chế phẩm tỏi và cho thấy khoảng 0 -30h đầu sự ức chế gần như hoàn toàn.

Kết quả thu được mở ra triển vọng sử dụng tỏi như một chất bảo quản thực phẩm an toàn để hạn chế các vi sinh vật có hại mà trong đó tỏi được sử dụng như một gia vị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Tất Thắng* (người dịch) - Tỏi, Khoa học và tác dụng chữa bệnh - Nhà xuất bản y học, 2000.
2. *Bhurinder Singh, M. Bernadette Falahee and Martin. R. Adams* - Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract - Journal of Food Microbiology, Vol 18. 133-139, 2001.
3. *Lawson, L.D* - The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic - Planta Med, 1996.
4. *Mei Chin Yin, Hui Ching Chang and Shyh Ming Tsao* - Inhibitory Effects of Aqueous Garlic Extract, Garlic Oil and Four Diallyl Sulphides against Four Enteric Pathogens - Journal of Food and Drug Analysis. Vol 10, No2, 120-126, 2002.
5. *Naganaw. R, Iwata. N, ...Suzuki. A* - Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic - Journal of Applied and Environmental Microbiology, Vol 62, No11, 4238-4242, Nov1996.
6. *Whitmore and A. S. Naidu* - Natural food antimicrobial systems -Thiosulfinate, 2003.
7. *Z. M. Rose, ...* Antimicrobial Properties of Garlic Oil against Human Enteric Bacteria: Evaluation of methodologies and Comparisons with Garlic Oil Sulfides and Garlic Powder - Journal of Applied and Environmental Microbiology. Vol 67(1), 475-480, Jan 2001.