NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO SẢN PHẨM CHỐNG NẤM MỐC CHO GIÀY DA QUÂN NHU TỪ NGUYÊN LIỆU QUẾ

VÕ THỊ HOÀI THU, NGUYỄN TRỌNG DÂN, ĐINH THỊ THU TRANG,
NGUYỄN TRƯỜNG GIANG, ĐỖ THỊ THÚY

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm của nước ta, sản phẩm giày da quân nhu trong khi bảo quản và khi cấp phát thường hay bị mốc, làm giảm chất lượng của sản phẩm. Hiện nay giày da quân nhu được chống nấm mốc bằng các túi hút ẩm silicagel. Tuy nhiên, sau một thời gian ngắn để trong không khí ẩm thì silicagel sẽ bão hòa nước, làm mất tác dụng hút ẩm, nên nấm mốc tiếp tục phát triển. Xuất phát từ thực tiễn đó, nhóm tác giả lựa chọn giải pháp dùng chất chống nấm mốc cho giày da quân nhu.

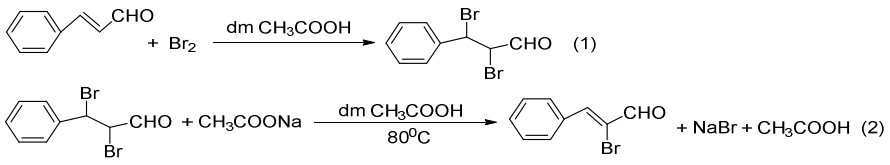
Trong số các chất có hoạt tính chống nấm mốc, α-brom cinnamaldehyde có tác dụng chống nấm mốc phổ rộng [1, 3, 4, 5, 6] và được tổng hợp từ cinnamaldehyde với hiệu suất 68÷91% [6, 7]. Trong nghiên cứu này nhóm tác giả sử dụng tinh dầu quế của Việt Nam để làm nguyên liệu tổng hợp α-brom cinnamaldehyde và từ đó chế tạo sản phẩm chống nấm mốc cho giày da quân nhu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tinh dầu quế bán trên thị trường được phân tích có hàm lượng cinnamaldehyde là 85%, chất mang silicagel 60, 0,04÷0,06 mm của hãng Scharlau. Điểm nóng chảy được đo trên máy Bansted Electrothermal 9100 (Anh), tốc độ gia nhiệt 1^{o}C/phút. Hàm lượng chất được đo trên máy UV-VIS 8453 (AGILENT, Mỹ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H và ^{13}C được đo trên máy ADVANCE Spectrometer (BRUCKER, Germany) ở tần số 500 MHz và 125MHz, dung môi DMSO-d_6, phổ IR được đo trên máy FTIR Affinity-1S. Các loại phổ đều được đo tại Trung tâm Các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam. Giày da quân nhu nhiễm nấm mốc thu thập từ các kho bảo quản thuộc Viện Nghiên cứu và ứng dụng quân nhu. Các chủng nấm mốc được phân lập và thử nghiệm tại Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga. Định danh dựa trên hình thái khuẩn lạc và tế bào tiến hành tại Viện 69, Bộ Tư lệnh Lăng.

2.1. Chuyển hóa tinh dầu quế thành α-brom cinnamaldehyde

α-brom cinnamaldehyde được tạo thành từ tinh dầu quế theo các phương trình phản ứng và quy trình sau:



Cân 61,1 g tinh dầu quế (tương ứng với 0,394 mol cinnamaldehyde) vào bình cầu ba cổ 500 ml, thêm 150 ml axit axetic băng. Đặt bình cầu trên bếp từ có nồi cách thủy có sinh hàn hồi lưu. Bật máy khuấy từ, nhỏ từ từ 21 ml brom (0,395 mol) trong khoảng 15 phút, sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng thêm 10 phút (kết thúc phản ứng 1). Tiến hành gia nhiệt hỗn hợp lên 80^oC, thêm 32,47 g natri axetat (0,4 mol), khuấy mạnh hỗn hợp phản ứng trong 1 giờ (kết thúc phản ứng 2). Sau đó đổ hỗn hợp vào 500 g đá, lọc sản phẩm trên phễu lọc Buchner, rửa 3 lần x 200 ml nước cất, kết tinh lại toàn bộ sản phẩm trong 250 ml etanol 96% để trong tủ 4^oC trong khoảng 12 giờ, lọc sản phẩm và rửa 2 lần x 30 ml etanol 96% lạnh. Làm khô sản phẩm ở 50^oC trong 5 giờ thu được 68,2 g α-brom cinnamaldehyde, hiệu suất tính theo cinnamaldehyde là 82%, T_{nc} = 71,2÷72,3^oC. Độ tinh khiết 99,1% theo phương pháp phân tích UV-VIS.

2.2. Phân lập mẫu giày da quân nhu bị nhiễm nấm mốc

Mẫu giày da quân nhu được xác định vùng bị nhiễm nấm, dùng tăm bông sạch đã khử trùng quết lên bề mặt giày bên ngoài và bên trong sau đó cho vào ống nghiệm chứa nước muối sinh lý đã khử trùng. Tiến hành pha loãng đến nồng độ thích hợp. Hút 0,1 ml dung dịch ở một nồng độ pha loãng lựa chọn cho vào đĩa petri chứa môi trường Czapek đã khử trùng. Dùng que trang dàn đều dịch trên bề mặt thạch. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30^oC, trong thời gian 48÷72 giờ. Quan sát sự phát triển của nấm mốc, chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy sang đĩa thạch khác để thu các chủng nấm thuần khiết và mang định danh.

2.3. Xác định hàm lượng ức chế tối thiểu của α-brom cinnamaldehyde đối với các chủng nấm mốc phân lập được

Sử dụng các chủng nấm mốc phân lập được cùng với chủng *Aspergillus niger* được sử dụng để nghiên cứu và thu dịch bào tử. Phun đều dịch chứa bào tử nấm mốc đã chuẩn bị lên đĩa môi trường PDA, dùng que trang trải đều, mỗi chủng lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ nghiên cứu. Các đĩa thí nghiệm được đặt vào các hộp nhựa thể tích 5 lít (tương đương với thể tích của hộp đựng giày da quân nhu) có treo giấy đã tẩm chất ức chế nấm mốc α-brom cinnamaldehyde với hàm lượng 1 mg; 3 mg; 5 mg và 7 mg, bổ sung nước để ổn định độ ẩm. Đặt nuôi trong điều kiện môi trường và tiến hành đánh giá sau 28 ngày.

2.4. Chế tạo sản phẩm chống nấm mốc và đánh giá hàm lượng của α-brom cinnamaldehyde theo thời gian

2.4.1. Chế tạo sản phẩm chống nấm mốc trên chất mang silicagel

Cân các lượng α-brom cinnamaldehyde khác nhau là 2,5284 g; 1,7836 g và 1,1223 g cho vào bình cầu 1 cổ 100 ml. Thêm 30 ml axeton và lắc đều cho chất rắn tan hoàn toàn. Thêm 10 g silicagel vào và cất cô quay chân không loại bỏ axeton ở 30^oC trong 30 phút. Sau đó đổ chất rắn ra cối sứ và nghiền mịn, cân chính xác 1 gam sản phẩm cho vào túi vải xốp kích thước 3 x 3 cm và hàn kín. Như vậy, với các lượng cân khác nhau ở trên thì mỗi túi sản phẩm tương ứng sẽ chứa 200 mg; 150 mg và 100 mg α-brom cinnamaldehyde.

2.4.2. Đánh giá hàm lượng α-brom cinnamaldehyde của sản phẩm theo thời gian

Các mẫu sản phẩm trong mục 2.4.1 được đặt vào hộp giày da quân nhu thể tích 5,3 lít, đậy kín nắp hộp (đúng với tình trạng đựng giày). Để trong phòng ở nhiệt độ 28÷33^{o}C. Định kỳ phân tích hàm lượng α-brom cinnamaldehyde còn lại trong mẫu sản phẩm theo thời gian bằng phương pháp UV-VIS, từ đó rút ra quy luật tốc độ bay hơi của α-brom cinnamaldehyde trong sản phẩm theo thời gian.

2.5. Thử nghiệm gia tốc đánh giá khả năng ức chế nấm mốc của sản phẩm trên giày da quân nhu

Chuẩn bị dịch bào tử tiến hành tương tự mục 2.3. Mẫu thí nghiệm khác với mẫu đối chứng là được đặt kèm túi mẫu sản phẩm chứa chất chống nấm mốc. Các mẫu giày sau khi được phun bào tử sẽ được đặt vào hộp duy trì độ ẩm khoảng 90% và đặt vào thiết bị ổn nhiệt ở nhiệt độ 30^{o}C. Sau 7, 14 và 28 ngày quan sát và đánh giá sự phát triển của nấm mốc trên bề mặt giày thí nghiệm và đối chứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuyển hóa tinh dầu quế thành α-brom cinnamaldehyde

Trong quy trình (mục 2.1) α-brom cinnamaldehyde được tổng hợp trực tiếp từ tinh dầu quế của Việt Nam, dung môi axit axetic, chất bazơ natri axetat. Hiệu suất tổng hợp là 82%, độ tinh khiết 99,1% theo phương pháp phân tích UV-VIS ở bước sóng 298 nm, nhiệt độ nóng của sản phẩm 71,2÷72,3^{o}C. Theo [6] hiệu suất tổng hợp 69÷86%, nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm 70÷72^{o}C. Theo [7] hiệu suất tổng hợp là 91%, nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm 69÷71^{o}C. Như vậy điểm chảy của sản phẩm phù hợp với điểm chảy của α-brom cinnamaldehyde theo các tài liệu đã công bố.

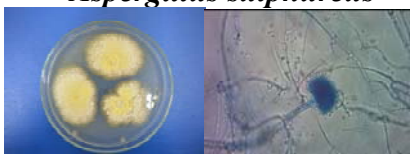
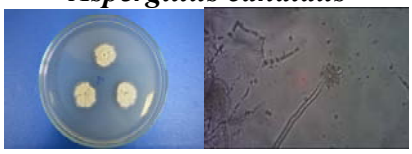
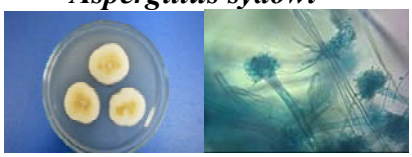
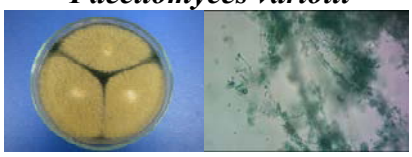
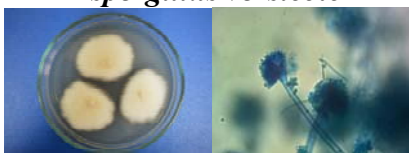
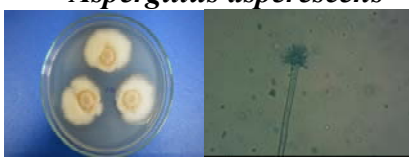
Cấu trúc hóa học của sản phẩm tổng hợp được xác nhận thông qua bộ phổ: **Phổ IR (KBr), $\bar{\upsilon}$(cm^{-1}):** 761(C-Br); 1570; 1487; 1446(C=C benzen); 1602(C=C anken); 1689(C=O, strong); 3053(CH=C). **Phổ ^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, 500 MHz), δ_H(ppm), J(Hz):** 7,56(dd, 3H, J=2,5; 5); 8,03(dd, 2H, J=2; 6,25); 8,43(s, 1H); 9,41(d, 1H, J=2,5). **Phổ ^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$, 125 MHz), δ_C(ppm):** 123,9; 128,8; 130,6; 131,5; 132,9; 150,4; 188,1. Như vậy, các số liệu phổ IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR của sản phẩm phù hợp với cấu trúc của α-brom cinnamaldehyde. Điều này khẳng định α-brom cinnamaldehyde đã được tổng hợp từ tinh dầu quế.

Quy trình trong mục 2.1 có ưu điểm tận dụng nguồn nguyên liệu sẵn có của Việt Nam, dùng tinh dầu quế làm nguyên liệu phản ứng trực tiếp mà không cần tinh chế để thu nhận cinnamaldehyde tinh khiết sau đó mới tổng hợp α-brom cinnamaldehyde như [6, 7]. Hiệu suất tổng hợp cao (khoảng 82%), quy trình đơn giản, có thể khẳng định việc tổng hợp α-brom cinnamaldehyde từ tinh dầu quế của Việt Nam là hoàn toàn chủ động.

3.2. Phân lập nấm mốc trên giày da quân nhu.

Từ 4 mẫu giày nhiễm nấm mốc, phân lập và thuần khiết được 6 chủng nấm mốc với những đặc điểm màu sắc và hình dạng khuẩn lạc khác nhau. Bằng phương pháp phân loại dựa trên hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và cấu trúc cuống sinh bào tử, các chủng nấm mốc phân lập đã được định tên (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần loài của 6 chủng nấm mốc phân lập được trên giày da quân nhu

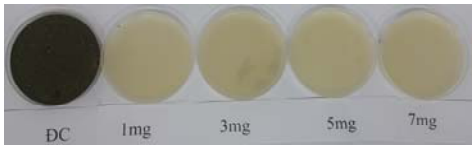
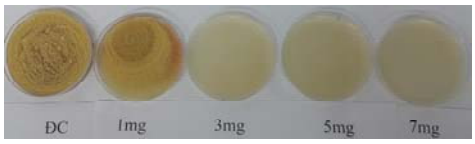
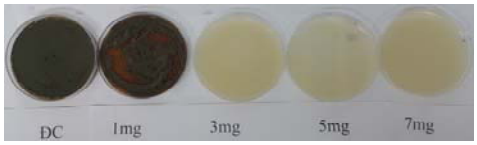
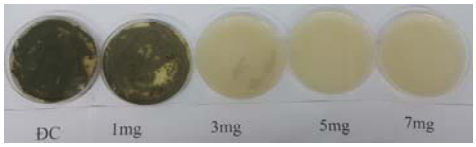
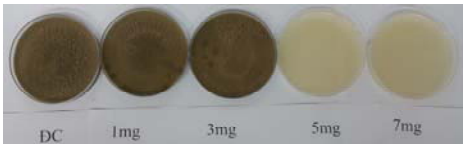
TT	Tên loài	Mô tả
1	***Aspergillus sulphureus*** 	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek có màu trắng đến kem hoặc đến màu vàng nhạt do có sự sinh ra nhiều hạch nấm tạo thành lớp dày ở vùng trung tâm khuẩn lạc. Cuống sinh bào tử thường dài có kích thước 500÷600 x 6.0÷8.0µm, thành dày đến 1.0 µm, nhẵn đến ráp.
2	***Aspergillus candidus*** 	Khuẩn lạc trên môi trường mỏng, hệ sợi chìm, các cấu trúc sinh bào tử sinh trực tiếp từ hệ sợi nền hoặc từ sợi khí sinh, màu trắng hoặc kem; cuống sinh bào tử kích thước thay đổi không màu, nhẵn.
3	***Aspergillus sydowi*** 	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek mọc nhanh. Bề mặt dạng nhung, mịn hoặc xốp nhẹ được sinh ra từ các đám của cuống và đầu sinh bào tử trần, có màu lục lơ đến xanh đậm. Giọt tiết thường nhiều, màu vàng rơm đến nâu đỏ.
4	***Paecilomyces variotii*** 	Khuẩn lạc bao gồm cuống sinh bào tử tạo thành một lớp dày dạng phấn trên bề mặt khuẩn lạc, có màu nâu vàng đến màu cát. Cuống sinh bào tử gồm nhiều lớp tạo thành các nhánh, mỗi nhánh mang 2÷7 thể bình.
5	***Aspergillus versicolor*** 	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển chậm màu trắng xám đến lục xám nhạt; hệ sợi nấm màu trắng; mặt trái màu vàng nhạt đến màu nâu kem; cuống sinh bào tử có kích thước 100÷700 x 4.0÷8.5µm, màu nâu nhạt, thành nhẵn.
6	***Aspergillus asperescens*** 	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek màu lục vàng xám đến oliu xám; hệ sợi nấm màu trắng, nâu nhạt đến màu da; mặt trái màu vàng nhạt đến đỏ san hô; cuống sinh bào tử có kích thước 80÷700 x 4.0÷9.5µm, màu nâu vàng nhạt, thành dày, nhẵn.

Các chủng nấm mốc được bảo quản và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Hàm lượng ức chế tối thiểu của α-brom cinnamicaldehyde với các chủng nấm mốc phân lập được

Sau 28 ngày thử nghiệm theo mục 2.3 thu được kết quả thử nghiệm như bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng ức chế tối thiểu của α-brom cinnamaldehyde với một số chủng nấm nấm mốc phân lập được trên giày sau 28 ngày

Tên chủng	Hàm lượng ức chế tối thiểu (mg/5l)	Hình ảnh thí nghiệm
Aspergillus candidus	1	
Aspergillus sydowi	1	
Aspergillus sulphureus	3	
Aspergillus asperescens	3	
Aspergillus versicolor	3	
Paecilomyces variotii	5	
Aspergillus niger	5	
Mix chủng	5	

Kết quả trong bảng 2 cho thấy hàm lượng ức chế tối thiểu đối với các chủng nấm mốc khác nhau là khác nhau, có những chủng với hàm lượng α-bromcinnamaldehyde là 1mg đã có tác dụng ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm mốc trên môi trường thạch (*Aspergillus candidus, Aspergillus sydowi)*, song có những chủng với hàm lượng chất chống nấm mốc lên đến 3 mg vẫn còn có hiện tượng nấm mốc phát triển mạnh trên đĩa thạch (*Paecilomyces variotii, Aspergillus niger)*. Từ kết quả trên lựa chọn hàm lượng ức chế tối thiểu chung cho tập hợp chủng nấm mốc dùng cho thử nghiệm là 5 mg.

3.4. Hàm lượng α-brom cinnamaldehyde trong sản phẩm theo thời gian

Kết quả hàm lượng của α-brom cinnamaldehyde còn lại trong sản phẩm theo thời gian thử nghiệm theo mục 2.4.2 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng của α-brom cinnamaldehyde trong sản phẩm theo thời gian

STT	Thời gian thử nghiệm (tháng)	Hàm lượng α-brom cinnamaldehyde (mg)		
1	0	200	150	100
2	1	190	139	92
3	2	181	126	81
4	3	170	115	73
5	4	158	110	66

Dựa vào kết quả trong bảng 3 và kết quả thử nghiệm từ mục 3.3 có thể ngoại suy một cách gần đúng thời gian chống nấm mốc của các sản phẩm với giày da quân nhu theo bảng 4.

Bảng 4. Thời gian chống nấm nấm mốc của sản phẩm

STT	Sản phẩm tương ứng với α-brom cinnamaldehyde (mg)	Thời gian chống nấm mốc (tháng)
1	200	18,8
2	150	13,8
3	100	10,9

Vì thời gian vận chuyển, lưu kho của giày da quân nhu từ 12÷18 tháng nên chọn mẫu sản phẩm có chứa 200 mg α-brom cinnamaldehyde để tiến hành thử nghiệm gia tốc trên giày và sử dụng làm sản phẩm để chống nấm mốc cho giày trong bảo quản sau này.

3.5. Kết quả thử nghiệm gia tốc đánh giá khả năng ức chế nấm mốc trên giày da quân nhu của sản phẩm

Kết quả cho thấy trong quá trình thử nghiệm theo mục 2.5, các chủng nấm mốc đều không sinh trưởng trong điều kiện có α-brom cinnamaldehyde.

Các kết quả thử nghiệm trên giày da quân nhu trong điều kiện gia tốc cho thấy sau 7 ngày đặt thí nghiệm chưa thấy sự xuất hiện của nấm mốc trên cả mẫu đối chứng và mẫu thí nghiệm. Nhưng sau 14 ngày, ở mẫu đối chứng đã thấy rõ sự phát triển của hệ sợi nấm mốc lác đác trên bề mặt giày và sau 28 ngày nấm mốc vẫn phát triển mạnh trên toàn bộ bề mặt giày, đặc biệt tại các đường chỉ may, trong khi đó ở mẫu thí nghiệm chưa thấy sự xuất hiện của nấm mốc. Điều này cho thấy hiệu quả ức chế mạnh của hợp chất α-brom cinnamaldehyde tới sự phát triển của nấm mốc trên giày da quân nhu.

4. KẾT LUẬN

- Đã tổng hợp được α-brom cinnamaldehyde từ tinh dầu quế với hiệu suất khoảng 82%, độ tinh khiết đạt 99,1%. Cấu trúc của nó được xác nhận bằng các phương pháp phổ IR, NMR.

- Phân lập và định tên được 6 chủng nấm mốc từ các mẫu giày da quân nhu nhiễm nấm mốc: *Aspergillus sulphureus, Aspergillus candidus, Aspergillus sydowi, Paecilomyces variotii, Aspergillus versicolor, Aspergillus asperescens.*

- Chế tạo sản phẩm chống nấm mốc trên chất mang silicagel dưới dạng túi bột có khối lượng 1g, hàm lượng α-brom cinnamaldehyde trong sản phẩm là 200 mg. Kết quả thử nghiệm gia tốc của sản phẩm cho thấy hiệu quả ức chế mạnh của hợp chất α-brom cinnamaldehyde tới sự phát triển của nấm mốc trên mẫu giày da quân nhu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Xuân Đồng, Hà Huy Kế, *Nấm nấm mốc và phương pháp phòng chống*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, 1999.
2. Ngô Văn Thu, *Bài giảng dược liệu*, tập 1, Trường Đại học Dược Hà Nội, 2011.
3. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Tiến, Phạm Văn Ty, *Vi sinh vật học*, Nxb. Giaos dục, 2000.
4. Trần Danh Đáng, *Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chống nấm nấm mốc áp dụng trong sản xuất và lưu thông các loại giày vải, giày da xuất khẩu,* Báo cáo đề tài KC.06.16.CN, Công ty Da giày Hà Nội, 2005.
5. Rosmoore H. W., *Handbook of biocide and preservative use,* Springer, Sience and Business media, 1995.
6. Patents CN 101898944 B: *Method for preparing alpha-bromo-cinnamaldehyde.*
7. Patents CN 1086204 A: *Synthetic method for aphla-bromo-cinnamaldehyde.*

SUMMARY

STUDY ON PREPARATION OF ANTI-MOULD PRODUCT FOR MILITARY LEATHER SHOES FROM CINNAMON MATERIAL

This paper shows the process of preparation of an anti-mold product containing α-brom cinnamaldehyde transformed from Vietnam cinnamon oil. The obtained α-brom cinnamaldehyde in the product is confirmed by modern chemical physic methods such as: IR, 1H-NMR, 13C-NMR. 6 strains of mould on military leather shoes are isolated and identified by morphology characters. The obtained product is examined by acceleration test method. The result indicates strong inhibitory effect of α-brominated cinnamaldehyde on the development of the mould destroying military leather shoes.

Từ khóa: Tinh dầu quế, α-brom cinnamaldehyde, nấm mốc, thử nghiệm gia tốc.

Nhận bài ngày 09 tháng 5 năm 2016

Hoàn thiện ngày 03 tháng 6 năm 2016

Phòng Sinh hóa, Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga