

Tối ưu một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình thu nhận hợp chất tannin có hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* từ lá cây bàng (*Terminalia catappa* L.)

Lê Thị Huyền^{1*}, Trương Minh Ngọc¹, Hồ Viết Thế², Nguyễn Bá Thọ¹, Nguyễn Thị Liên¹

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh, 366A Trường Chinh, phường 13, quận Tân Bình, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Công Thương TP Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn, phường Tây Thạnh, quận Tân Phú, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/7/2023; ngày chuyển phản biện 7/7/2023; ngày nhận phản biện 18/7/2023; ngày chấp nhận đăng 21/7/2023

Tóm tắt:

Cây bàng (*Terminalia catappa* L.) là một cây thuốc quan trọng trong y học dân gian để điều trị các triệu chứng rối loạn tiêu hóa và các tình trạng viêm nhiễm. Loài cây này chứa nhiều thành phần thiết yếu về mặt y học, đặc biệt là nhóm tannin. Nghiên cứu này đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất tannin trong lá cây bàng với sự hỗ trợ của phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Các yếu tố được sử dụng để đánh giá là nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi:nguyên liệu (DM:NL) (v/w) và thời gian ngâm chiết (giờ). Kết quả cho thấy, hàm lượng tannin tổng (TTC) cao nhất là 1,54 mg TAE/g nguyên liệu, các điều kiện tối ưu được xác định như sau: Ethanol (EtOH) 54%, tỷ lệ DM:NL là 41:1 (v/w) với thời gian ngâm chiết là 2 giờ. Các giá trị thực nghiệm (TTC=1,54±0,02 mg TAE/g nguyên liệu) cho thấy sự phù hợp tốt với giá trị dự đoán (TTC=1,54 mg TAE/g nguyên liệu). Thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn cho thấy loại cao thu được qua chiết xuất tối ưu từ lá cây bàng có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả của nghiên cứu này có thể tạo tiền đề cho việc sản xuất các hợp chất loại được liệu có thành phần tannin từ lá bàng cũng như nâng cao giá trị sử dụng của loại cây trồng phổ biến này.

Từ khóa: đáp ứng bề mặt, tannin, *Terminalia catappa* L., *Vibrio parahaemolyticus*.

Chỉ số phân loại: 2.4

1. Đặt vấn đề

Trong 40 năm qua, ngành nuôi trồng thủy sản tôm của châu Á bị ảnh hưởng bởi các đợt dịch bệnh, đặc biệt là bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND), dẫn đến thiệt hại đáng kể về thu nhập quốc dân [1], gây thiệt hại 43 tỷ USD cho ngành nuôi tôm trên toàn cầu [2]. Tác nhân gây bệnh chính của AHPND là *V. parahaemolyticus* [3-5]. Nhóm *Vibrio* được biết như là tác nhân chính gây ngộ độc thực phẩm trong các sản phẩm thủy hải sản tươi sống châu Á. Kháng kháng sinh ở *V. parahaemolyticus* đã được công nhận là mối đe dọa nghiêm trọng đối với an toàn thực phẩm [6]. *V. parahaemolyticus* là tác nhân gây bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính ở người [7], chủ yếu sau khi tiêu thụ hải sản sống, nấu chưa chín hoặc xử lý sai [8]. Do những đặc tính gây độc này, *V. parahaemolyticus* trở thành một trong những đối tượng đã và đang được quan tâm trong các nghiên cứu, với mục đích kiểm soát vi khuẩn gây bệnh bằng cách tìm vật liệu kháng khuẩn mới.

Thực vật là nguồn nguyên liệu tiềm năng và phong phú để nghiên cứu tìm các hoạt chất kháng khuẩn mới. Có nhiều loài thực vật khác nhau đã được chứng minh có nhiều hợp chất với các hoạt tính sinh học khác nhau được ứng dụng trong y học, đặc biệt là y học dân gian sử dụng các cây thuốc chứa hoạt chất có tính kháng khuẩn [9]. Cây bàng thuộc họ *Combretaceae* được tìm thấy ở các vùng nhiệt đới của châu Á, châu Phi và châu Đại Dương. Trong chiết

xuất từ lá của cây bàng có chứa 3,20% alkaloid, 11,66% saponin, glycoside cyanogenic 7,84%, flavonoid 10,49%, tannin 1,24% và phenol 0,80% [10]. Tannin trong lá cây bàng có 2 nhóm là tannin thủy phân và không thủy phân, tannin thủy phân được ứng dụng nhiều trong kháng oxy hóa và kháng khuẩn [11]. Dịch chiết từ lá bàng có khả năng tiêu diệt được vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [12]. Nồng độ tối thiểu của dịch chiết lá cây bàng có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. harveyi* là 1,56% và nồng độ tối thiểu có khả năng tiêu diệt là 3,12% [13].

Hàm lượng TTC trong quá trình ly trích có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau. Cụ thể như dung môi ngâm chiết, thời gian ngâm chiết và tỷ lệ DM:NL được xem là những yếu tố chính ảnh hưởng đến TTC. Phương pháp phổ biến nhất là tiếp cận “từng yếu tố một”. Phương pháp này dựa trên việc cố định tất cả các tham số ngoại trừ một biến độc lập có ảnh hưởng riêng đến các thành phần môi trường và điều kiện, cách tiếp cận này là dễ dàng và đơn giản. Mặt khác, nó tốn thời gian và sự tương tác giữa các yếu tố khác nhau có thể bị bỏ qua, do đó cơ hội đạt được mức tối ưu thực sự là rất khó xảy ra [14, 15]. Phương pháp RSM có thể khắc phục những khó khăn này, vì nó cho phép tính toán các tác động tương tác có thể có giữa các biến [16]. Nếu được sử dụng đầy đủ, công cụ mạnh mẽ này có thể cung cấp các điều kiện tối ưu giúp cải thiện quy trình [17]. Chúng hiệu quả hơn cách tiếp cận “từng yếu tố một” trong việc sàng lọc các tương tác giữa các biến khác nhau và

*Tác giả liên hệ: Email: lethihuyen0404@gmail.com

Optimisation of the process of acquiring tannin compounds with anti - *Vibrio parahaemolyticus* from the leaves of sea almond tree (*Terminalia catappa* L.)

Thi Huyen Le^{1*}, Minh Ngoc Truong¹, Viet The Ho²,
Ba Tho Nguyen¹, Thi Lien Nguyen¹

¹National Center for Technological Progress, Ho Chi Minh City Branch,
366A Trung Chinh Street, Ward 13, Tan Binh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Industry and Trade,
140 Le Trong Tan Street, Tay Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 4 July 2023; revised 18 July 2023; accepted 21 July 2023

Abstract:

Terminalia catappa L. (so-called Bang in Vietnamese) is considered an important medicinal plant in folk medicine for the treatment of digestive disorders and other inflammatory conditions. This plant contains several medicinally essential components, especially the tannin group. This study evaluated a number of factors affecting tannin extraction from the leaves of sea almond tree with the help of response surface methodology (RSM). The factors used to evaluate are solvent concentration, solvent:material ratio (v/w) and soaking time (hours). Research results show that the highest total tannin content (TTC) is 1.54 mg GAE/g raw material, the optimal conditions are determined as follows: ethanol 54%, solvent:material ratio (S:MR) is 41:1 (v/w) and soaking time 2 hours. The experimental values (TTC=1.54±0.02 mg TAE/g raw material) show good agreement with the predicted value (TTC=1.54 mg TAE/g raw material). Experiments evaluating antibacterial activity show that the optimal extract of sea almond tree leaves has the ability to resist *Vibrio parahaemolyticus* bacteria. The results of this study could pave the way for the mass production of medicinal compounds containing tannins from sea almond tree leaves and improve the usage value of this popular plant.

Keywords: response surface methodology, tannin, *Terminalia catappa* L., *Vibrio parahaemolyticus*.

Classification number: 2.4

mô tả vai trò tương tác của từng thành phần trong quy trình. Trong RSM, thiết kế Box-Behnken là một trong những mô hình phổ biến nhất để xác định các điều kiện tối ưu. Box-Behnken là một mô hình rất hiệu quả vì yêu cầu số lần chạy nhỏ. Đây là một giải pháp thay thế quan trọng để tránh các thí nghiệm tốn thời gian.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm áp dụng phương pháp RSM để tối ưu hóa quy trình thu nhận

hợp chất tannin từ lá cây bàng, với mục tiêu xác định được điều kiện chiết xuất tannin một cách tối ưu các thông số công nghệ như: nồng độ dung môi, tỷ lệ DM:NL, thời gian chiết xuất. Đánh giá được khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trong thủy sản của cao chiết giàu tannin của lá cây bàng, góp phần nâng cao giá trị cây bàng ứng dụng trong lĩnh vực thủy sản hiện nay.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá cây bàng được thu tại khuôn viên Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh. Lá bánh tẻ của cây bàng được thu hái vào mùa hè (khoảng tháng 4 đến tháng 5), lá trên cây sau khi thu hái về được rửa sạch, sau đó cắt nhỏ và sấy ở 55°C cho đến khi khối lượng không thay đổi. Tiếp đó, lá cây bàng được nghiền và rây để đạt kích thước ≤ 2 mm.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học thuộc Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh. Vi khuẩn được bảo quản ở điều kiện -80°C, sau đó hoạt hóa trên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) ở điều kiện khoảng 25°C trước khi sử dụng cho các thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng tannin:

Xác định loại dung môi chiết tách tannin thích hợp: Bột lá cây bàng được ngâm chiết lần lượt trong các dung môi methanol 50% (M50), EtOH 50% (E50) và nước với tỷ lệ DM:NL là 20:1 (v/w) trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc qua giấy lọc và xác định hàm lượng tannin.

Xác định nồng độ dung môi ly trích thích hợp: Bột lá cây bàng được ly trích với loại dung môi được chọn ở thí nghiệm trên với nồng độ dung môi 30, 50, 70 và 90%. Tỷ lệ DM:NL là 10:1 (v/w), ngâm trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc qua giấy lọc và xác định hàm lượng.

Xác định tỷ lệ DM:NL thích hợp: Bột lá cây bàng ngâm chiết với nồng độ dung môi thích hợp xác định được ở thí nghiệm trên với tỷ lệ DM:NL lần lượt 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1 và 45:1 (v/w) ngâm trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc qua giấy lọc và xác định hàm lượng tannin.

Xác định thời gian chiết tách thích hợp: Bột lá cây bàng ngâm chiết với nồng độ dung môi và tỷ lệ DM:NL thích hợp đã được xác định ở các thí nghiệm trên ở nhiệt độ 30°C trong thời gian chiết tách lần lượt là 2, 4, 6, 8, 12, 24 và 48 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc qua giấy lọc và xác định hàm lượng tannin.

2.2.2. Xác định điều kiện chiết tách tối ưu tannin: Dựa trên kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến hàm lượng tannin, các yếu tố đơn có ảnh hưởng được chọn để xây dựng quy trình tách chiết tối ưu hóa. Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình ly trích tannin từ lá cây bàng được bố trí theo kiểu mô hình Box-Behnken. Mô hình bao gồm 15 thí nghiệm, trong đó giá trị biên của 3 yếu tố được lựa chọn tối ưu là nồng độ dung môi (A), tỷ lệ DM:NL (B) và thời gian ngâm (C) được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Mã hóa các yếu tố khảo sát.

Yếu tố	Ký hiệu	Các giá trị được mã hóa		
		-1	0	1
Nồng độ EtOH (%)	A	30	50	70
Tỷ lệ DM:NL (v/w)	B	35:1	40:1	45:1
Thời gian ngâm chiết (giờ)	C	1	2	3

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 15 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm.

2.2.3. Phương pháp định lượng TTC: Xây dựng đường chuẩn acid tannic (dung dịch acid tannic chuẩn 0,1 mg/ml): hòa tan 25 mg acid tannic trong 25 ml nước rồi pha loãng tiếp với nước thành dung dịch theo tỷ lệ 1:10. Thực hiện trong điều kiện tránh ánh sáng. Dung dịch chỉ pha khi dùng. Sau đó pha thành các dãy nồng độ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 và 0,5 ml. Ứng với mỗi nồng độ dung dịch được thực hiện theo bảng 2.

Bảng 2. Công thức đường chuẩn tannin.

Ống nghiệm	Dung dịch acid tannic (0,1 mg/ml)	Nước cất (ml)
Đôi chứng	0,00	2,5
1	0,1	2,4
2	0,2	2,3
3	0,3	2,2
4	0,4	2,1
5	0,5	2,0

Tiếp theo, bổ sung 1,25 ml thuốc thử Folin-ciocalte và 6,25 ml dung dịch natri carbonat 20% (TT), lắc đều để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Đo độ hấp thụ của phức màu ở bước sóng 725 nm. Giá trị hấp thụ được ghi nhận để đường chuẩn được sử dụng cho việc xác định hàm lượng tannin trong các mẫu dịch chiết. Các mẫu dịch chiết được tiến hành tương tự với acid tannic chuẩn. Hàm lượng tannin được xác định theo phương pháp Folin-Denis dựa trên mô tả của W.S. Laitonjam và cs (2013) [18]. Hàm lượng tannin được tính theo công thức sau:

$$T = \frac{a \times V \times K}{1000 \times m \times (1 - w)}$$

trong đó: T là hàm lượng tannin tổng (mg/g vật liệu khô); a là giá trị x từ đường chuẩn với tannic acid (μg/ml); V là thể tích dung dịch trích (ml); K là độ pha loãng; m là khối lượng bột lá bàng (g); w là độ ẩm của bột lá bàng.

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: Sau khi đã xác định được điều kiện chiết xuất cao chiết chứa hàm lượng tannin tối ưu (nồng độ dung môi, tỷ lệ DM:NL, thời gian ngâm), các điều kiện này sẽ được áp dụng trong quá trình ly trích cao chiết từ lá cây bàng. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết được thực hiện trên chủng vi khuẩn *V. Parahaemolyticus*.

2.2.5. Xác định khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết tối ưu lá cây bàng: Khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết lá cây bàng giàu hàm lượng tannin được xác định dựa trên sự hình thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ cao chiết, dựa trên mô tả của N.T.H. Nhi (2020) [19]. Dịch vi khuẩn với mật số 10^6 CFU/ml được trải đều trên bề mặt đĩa thạch Luria Bertani (LB) với thể tích dịch khuẩn là 100 μl. Các đĩa petri chứa vi khuẩn được đục lỗ tạo giếng thạch có đường kính 7 mm, sau đó, 50 μl dịch chiết tối ưu lá cây bàng ở các nồng độ khác nhau được nhỏ vào mỗi giếng. Đường kính vòng kháng vi khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm (không bao gồm đường kính giếng thạch 7 mm), sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 30°C.

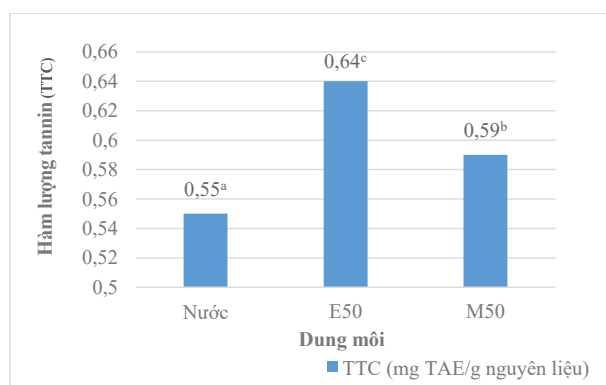
2.3. Xử lý và phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± giá trị độ lệch phương sai (mean±SD). Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVII phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và phân tích phương sai ANOVA ($p < 0,05$) đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Thiết kế thí nghiệm và xử lý kết quả RSM theo mô hình Box-Behnken bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVII.

3. Kết quả và bàn luận

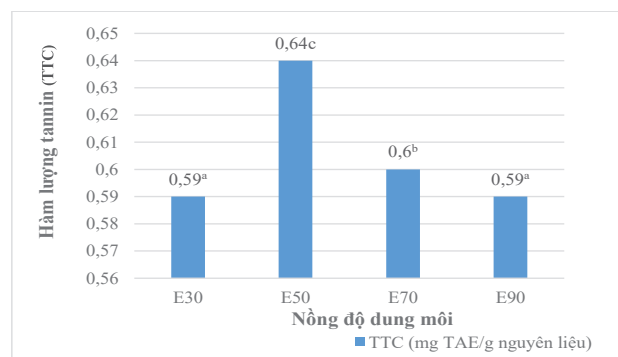
3.1. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng tannin

Độ hòa tan của tannin có thể thay đổi, vì vậy tùy thuộc vào hợp chất mục tiêu, các dung môi có độ phân cực tương đối khác nhau có thể được chọn, chẳng hạn như nước, EtOH, axeton hoặc metanol. Tannin cô đặc có độ hòa tan hạn chế trong dung môi hữu cơ phân cực, trong khi nước hoặc EtOH là dung môi thường được sử dụng để chiết xuất tannin thủy phân [11]. Lựa chọn được loại dung môi phù hợp sẽ giúp tăng hiệu quả đồng thời giảm chi phí và thời gian tách chiết. Kết quả hình 1 cho thấy hàm lượng tannin của dung môi EtOH là cao nhất (0,64 mg TAE/g nguyên liệu), hàm lượng tannin của dung môi nước là thấp nhất (0,55 mg TAE/g nguyên liệu). Sự khác biệt về hàm lượng tannin ở các loại dung môi khác nhau có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Kết quả lựa chọn dung môi cho thấy, EtOH cho khả năng tách chiết hợp chất có hàm lượng tannin cao nhất trong các loại dung môi trong khảo sát, vì vậy dung môi EtOH được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng tannin.
a, b, c: các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$.

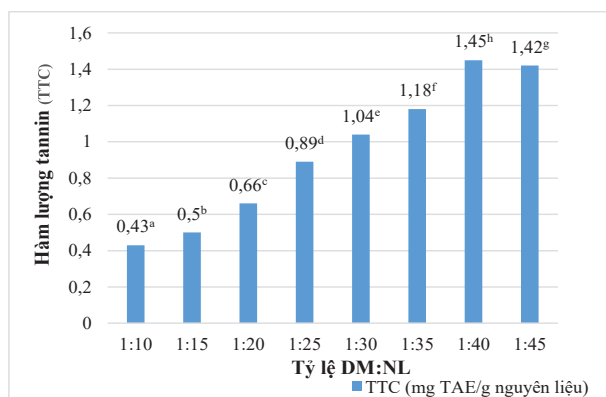
I.S. Che Sulaiman và cs (2017) [20] cho rằng, việc phối trộn EtOH với nước có thể làm tăng hiệu suất ly trích các hợp chất thiên nhiên. Trong nghiên cứu này, dung môi EtOH đã được pha loãng để tạo các môi trường dung môi có độ phân cực khác nhau với mục đích tìm ra được nồng độ EtOH thích hợp cho quá trình chiết xuất tannin từ lá cây bàng. Điều này có thể giải thích rằng, việc tăng hàm lượng nước trong hệ dung môi gây ra hiện tượng trương nở ở thực vật dẫn đến tăng tiếp xúc giữa các tế bào thực vật và dung môi, do đó góp phần tăng năng suất tách chiết. Kết quả khảo sát nồng độ dung môi trực trình bày ở hình 2. Kết quả cho thấy, với nồng độ EtOH 50% cho hàm lượng tannin cao nhất với hàm lượng 0,64 mg TAE/g nguyên liệu, sau đó giảm dần qua các nồng độ EtOH 70 và 90%. Theo N. Medina-Torres và cs (2017) [21], dung môi hữu cơ tinh khiết như cồn cao độ có thể làm biến tính protein ở thành tế bào, gây khó khăn cho việc khuếch tán các hợp chất vào trong dung môi, hỗn hợp dung môi cồn - nước sẽ thích hợp hơn cho việc chiết xuất, cả những hợp chất phân cực lẫn không phân cực. Trong khảo sát này, nồng độ EtOH 50% được chọn làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng tannin.
a, b, c: các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$.

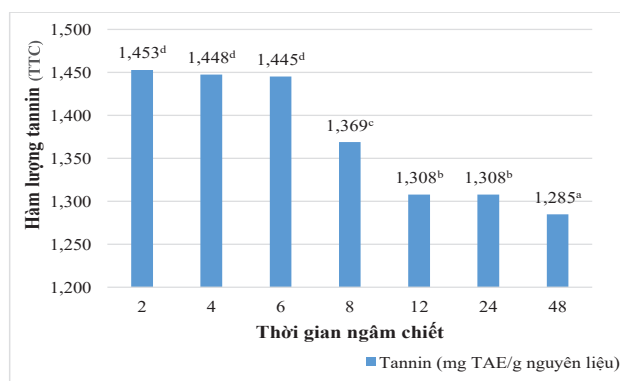
Tỷ lệ DM:NL có liên quan đến vấn đề diện tích tiếp xúc của vật liệu và dung môi, vì thế sẽ ảnh hưởng đến việc chiết xuất tannin. Đồng thời xác định được tỷ lệ phù hợp sẽ giúp tiết kiệm được nguyên liệu và chi phí dung môi sử dụng. Từ kết quả của hình 3 nhận thấy, hàm lượng tannin của tỷ

lệ 40:1 là cao nhất với chỉ số là 1,45 mg TAE/g nguyên liệu, sau đó hàm lượng tannin trong dịch chiết giảm dần khi tăng tỷ lệ DM:NL lên 45:1 với chỉ số 1,42 mg TAE/g nguyên liệu, hàm lượng tannin của 10:1 là thấp nhất với chỉ số là 0,43 mg TAE/g nguyên liệu. Điều này chứng minh rằng, khi bột lá cây bàng được phân tán hoàn toàn trong tỷ lệ dung môi cao do diện tích tiếp xúc lớn sẽ tăng cường quá trình trích ly. Tuy nhiên, khi thể tích dung môi tăng liên tục và diện tích tiếp xúc đạt tới mức bão hòa sẽ làm cho lượng TTC thu được không thay đổi nhiều [22]. Khi chiết tannin từ lá cây bàng, tỷ lệ DM:NL 40:1 thu được hàm lượng cao nhất nên được chọn để làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM:NL đến hàm lượng tannin.
a, b, c, d, e, f, g, h: các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$.

Thời gian ngâm chiết ảnh hưởng đến quá trình phân hủy của các hợp chất tự nhiên khi sử dụng thời gian quá dài, chính vì thế cần lựa chọn thời gian thích hợp cho quá trình thu nhận tannin từ lá cây bàng. Kết quả hình 4 cho thấy, thời gian ngâm 2 giờ cho hàm lượng tannin cao nhất với chỉ số là 1,453 mg TAE/g nguyên liệu, thời gian ngâm 48 giờ là thấp nhất với chỉ số là 1,285 mg TAE/g nguyên liệu. Điều này phản ánh rằng các hợp chất đã được trích ly hết sau 2 giờ ngâm. Hàm lượng tannin thu được ở thời điểm 2 giờ kể từ khi ngâm chiết có chỉ số cao nhất nên được làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến hàm lượng tannin.
a, b, c, d: các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$.

3.2. Kết quả xác định điều kiện chiết tách tối ưu tannin

Sau khi thực hiện các khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng tannin chiết tách từ lá cây bàng đã thu nhận được các giá trị tối ưu của từng yếu tố. Dựa vào kết quả trên, tiến hành bố trí thí nghiệm tối ưu hóa quá trình chiết tách tannin bằng phương pháp RSM với 3 yếu tố là nồng độ dung môi, tỷ lệ DM:NL và thời gian ngâm. Nồng độ EtOH được chọn từ 30 đến 70%, tỷ lệ DM:NL từ 35:1 đến 45:1 (v/w) và thời gian ngâm từ 1 đến 3 giờ. Hàm lượng tannin thu được từ thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken, tiến hành phân tích kết quả để chọn ra nồng độ tối ưu của các yếu tố tác động đến sự trích ly tannin. Kết quả thực nghiệm và giá trị dự đoán từ mô hình Box-Behnken của các nghiệm thức được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Mô hình bố trí thí nghiệm và hàm lượng tannin chiết tách được từ lá cây bàng.

Nghiệm thức	Điều kiện			Hàm lượng tannin (mg TAE/g nguyên liệu)	
	A (%)	B (v/w)	C (giờ)	Thực nghiệm	Dự đoán
NT1	70	45	2	1,427	1,408
NT2	50	45	3	1,336	1,308
NT3	70	40	3	1,370	1,338
NT4	50	35	1	1,206	1,194
NT5	30	40	3	1,348	1,338
NT6	50	35	3	1,116	1,107
NT7	70	35	2	1,214	1,215
NT8	30	45	2	1,341	1,340
NT9	30	35	2	1,193	1,212
NT10	70	40	1	1,369	1,379
NT11	30	40	1	1,356	1,348
NT12	50	45	1	1,264	1,274
NT13	50	40	2	1,538	1,533
NT14	50	40	2	1,525	1,533
NT15	50	40	2	1,536	1,533

Phương trình hồi quy:

$$Y = -10,795 + 0,00779A + 0,5828B + 0,1383C - 0,000136A^2 - 0,007390B^2 - 0,11775C^2 + 0,000163AB + 0,000113AC + 0,00810BC \quad (1)$$

trong đó: Y là hàm lượng tannin (mg TAE/g nguyên liệu); A: nồng độ EtOH (%); B: tỷ lệ DM:NL (v/w); C: thời gian trích ly (giờ). Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,9930, điều này thể hiện rằng có 99,30% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Giá trị R^2 lớn hơn 0,8 thể hiện mô hình tương thích với thực nghiệm có nghĩa là có sự tương quan rất chặt chẽ giữa các yếu tố thí nghiệm và hàm lượng tannin.

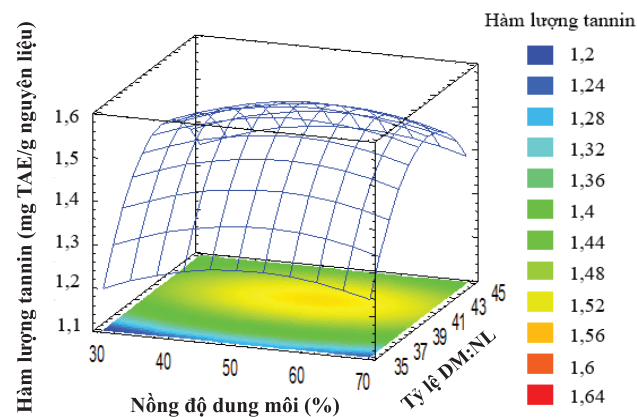
Tính tương thích của các hàm mục tiêu đối với thực nghiệm được thể hiện ở bảng 4. Hệ số sai số của mô hình (Lack of fit) có giá trị p-value là 0,089 (>0,05) cho thấy mô hình phù hợp với thực nghiệm.

Bảng 4. Phân tích phương sai cho mô hình thực nghiệm của tannin.

Nguồn	Tổng bình phương	Hệ số tự do	Trung bình bình phương	f-value	p-value
A: nồng độ dung môi	0,002521	1	0,002521	51,44	0,019
B: tỷ lệ DM:NL	0,051040	1	0,051040	1041,64	0,001
C: thời gian ngâm	0,000078	1	0,000078	1,59	0,334
A ²	0,010967	1	0,010967	223,82	0,004
AB	0,001056	1	0,001056	21,56	0,043
AC	0,000020	1	0,000020	0,41	0,586
B ²	0,126028	1	0,126028	2572,00	0,000
BC	0,006561	1	0,006561	133,90	0,007
C ²	0,051194	1	0,051194	1044,78	0,001
Lack-of-fit	0,001524	3	0,000508	10,37	0,089
Pure error	0,000098	2	0,000049		
Tổng số	0,232784	14			

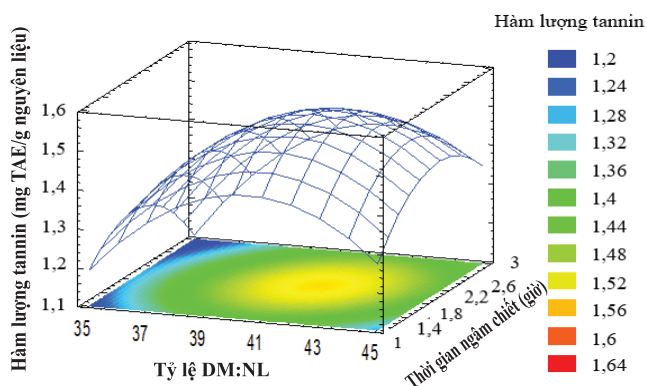
A: nồng độ EtOH (%); B: tỷ lệ DM:NL (v/w); C: thời gian trích ly (giờ).

Dựa trên kết quả phân tích ANOVA ở bảng 4, các tham số hồi quy bậc 1 và bậc 2 đều có $p < 0,05$ cho thấy phương trình hồi quy có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng tannin thu nhận được bị ảnh hưởng bởi các yếu tố bậc 1 là nồng độ EtOH (A) và tỷ lệ DM:NL (B), chịu ảnh hưởng của các yếu tố bậc 2 bao gồm tỷ lệ nồng độ EtOH (A^2), tỷ lệ DM:NL (B^2) và thời gian ngâm chiết (C^2). P-value của tham số C (thời gian) và AC cao hơn 0,05 (không có ý nghĩa thống kê) nên các tham số này ảnh hưởng không đáng kể đến mô hình thực nghiệm. Dựa vào bảng 4 và phương trình hồi quy (1) cho thấy, khi sử dụng hợp lý các yếu tố nồng độ EtOH (A), tỷ lệ DM:NL (B), sự kết hợp giữa nồng độ EtOH với tỷ lệ DM:NL (AB) và sự kết hợp giữa tỷ lệ DM:NL với thời gian ngâm (BC) sẽ mang lại tác động tích cực làm tăng hàm lượng tannin. Ngược lại, nếu quá lạm dụng các yếu tố nồng độ (A^2), tỷ lệ DM:NL (B^2) và thời gian (C^2) sẽ gây ra tác động tiêu cực làm giảm hàm lượng tannin chiết tách được từ lá cây bàng. Tương quan giữa các yếu tố trong phương trình hồi quy được biểu diễn ở các hình 5-7.



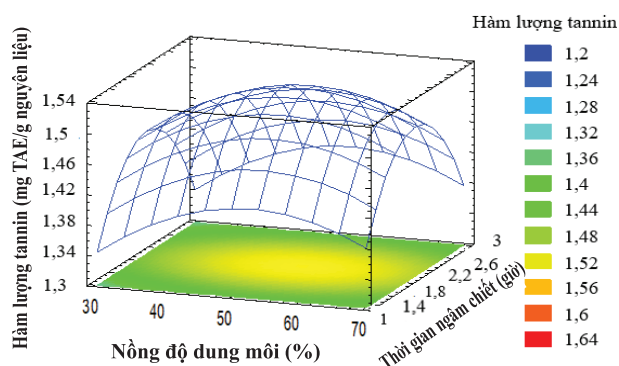
Hình 5. Tương quan giữa nồng độ dung môi EtOH và tỷ lệ DM:NL đến hàm lượng tannin.

Hình 5 mô tả sự ảnh hưởng của nồng độ EtOH và tỷ lệ DM:NL đến hàm lượng tannin thu nhận. Ở bất kỳ giá trị nồng độ EtOH nào, khi thay đổi tỷ lệ DM:NL từ 35:1 đến 45:1 sẽ làm thay đổi hàm lượng tannin. Cụ thể, ở bất kỳ nồng độ dung môi nào khi tăng tỷ lệ DM:NL từ 35:1 lên 40:1 sẽ làm tăng hiệu suất trích ly. Sự chênh lệch gradient nồng độ giữa bên trong và bề mặt vật liệu rắn càng cao, làm tăng sự khuếch tán của chất tan từ vật liệu ra môi trường hay làm tăng hiệu suất trích ly.



Hình 6. Tương quan giữa tỷ lệ DM:NL và thời gian ngâm đến hàm lượng tannin.

Hình 6 mô tả sự ảnh hưởng của tỷ lệ DM:NL và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng tannin thu nhận. Tại tỷ lệ DM:NL nhất định, khi tăng thời gian ngâm chiết từ 3 giờ thì hàm lượng tannin có xu hướng giảm do quá trình oxy hóa xảy ra trong dịch chiết khi thời gian trích ly quá lâu.



Hình 7. Tương quan giữa nồng độ EtOH và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng tannin.

Hình 7 mô tả sự ảnh hưởng của nồng độ EtOH và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng tannin thu nhận. Tại mốc thời gian xác định (1-3 giờ), khi tăng nồng độ dung môi chiết 30-70% thì hàm lượng tannin tăng và giảm ở nồng độ EtOH từ 70%. Nhưng khi đánh giá sự tương tác của nồng độ EtOH và thời gian ngâm (AC) thì không có ý nghĩa về mặt thống kê giữa hai yếu tố này (bảng 4).

Thiết kế thí nghiệm bằng phương pháp RSM để tìm ra các điều kiện tối ưu của từng yếu tố để cải thiện quy trình trích ly tannin từ lá bàng. Từ kết quả thực nghiệm thu được, tiến hành xác định các giá trị mã hóa tối ưu của từng yếu tố trong thí nghiệm

Các điều kiện chiết tách hàm lượng tannin trong lá cây bàng tối ưu đạt được từ mô hình với nồng độ EtOH là 53,95%, tỷ lệ DM:NL là 41,14 (v/w) và thời gian ngâm là 2,03 giờ thì giá trị hàm lượng tannin kỳ vọng là 1,54 mg TAE/g nguyên liệu.

Kết quả kiểm chứng thực nghiệm các điều kiện tách chiết tannin từ lá cây bàng cụ thể như sau: Nồng độ dung môi EtOH 54%, tỷ lệ DM:NL 41:1 (v/w) và thời gian ngâm 2 giờ thì hàm lượng tannin thực tế thu được là $1,54 \pm 0,02$ mg TAE/g nguyên liệu.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra thực nghiệm các thông số tối ưu từ phương trình hồi quy.

Giá trị tối ưu			Hàm lượng tannin (mg/g nguyên liệu)	
Tỷ lệ DM:NL (v/w)	Nồng độ EtOH (%)	Thời gian (giờ)	Thực nghiệm	Dự đoán
41:1	54	2,0	$1,54 \pm 0,02$	1,54

Kết quả bảng 5 cho thấy, hàm lượng tannin cao, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán từ phương trình hồi quy. Như vậy, kết quả tối ưu hóa phù hợp với thực nghiệm.

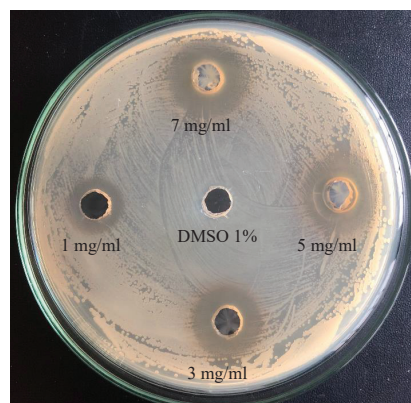
3.3. Kết quả kháng vi khuẩn *V. paraheamolyticus* của cao chiết tối ưu từ lá cây bàng

Mẫu cao chiết lá bàng được hòa tan bằng DMSO 1% ở các nồng độ 1, 3, 5 và 7 mg/ml. Tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch với chỉ tiêu theo dõi là đường kính vòng vô khuẩn thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết lá bàng kháng *V. paraheamolyticus*.

STT	Nồng độ cao chiết (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	DMSO 1%	$0,0 \pm 0,00$
2	1	$9,0 \pm 0,15$
3	3	$13,8 \pm 0,08$
4	5	$14,6 \pm 0,05$
5	7	$16,5 \pm 0,06$

a, b, c, d: các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$.



Hình 8. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết tối ưu từ lá cây bàng với vi khuẩn *V. paraheamolyticus*.

Hoạt tính kháng vi khuẩn *V. paraheamolyticus* của cao tối ưu lá cây bàng được xác định dựa vào sự hình thành vòng kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán giếng thạch trình bày ở bảng 6. Từ kết quả bảng 6 và hình 8 cho thấy, cao chiết tối ưu từ lá cây bàng có khả năng kháng vi khuẩn *V. paraheamolyticus*, kết quả này tương đồng với nghiên cứu của J. Velazquez-Roman và cs (2014) [8].

4. Kết luận

Phương pháp RSM đã được sử dụng để thiết kế thí nghiệm tách chiết tối ưu tannin từ lá cây bàng. Kết quả nghiên cứu đã xác định được các yếu tố đưa vào mô hình tối ưu hóa quy trình trích ly hàm lượng tannin từ lá cây bàng là nồng độ dung môi (A), tỷ lệ DM:NL (v/w) (B) và thời gian ngâm (C). Hàm lượng tannin từ lá cây bàng được thu nhận cao nhất là 1,54 mg TAE/g nguyên liệu, với các điều kiện tối ưu như sau: nồng độ dung môi EtOH 54%, tỷ lệ DM:NL 41:1 (v/w) và thời gian ngâm chiết 2 giờ. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn cho thấy: cao chiết tối ưu từ lá cây bàng có khả năng kháng vi khuẩn *V. paraheamolyticus*. Kết quả này là cơ sở cho việc nghiên cứu chiết xuất hợp chất tannin từ lá cây bàng nhằm ứng dụng vào lĩnh vực thủy sản hoặc các lĩnh vực có liên quan khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.P. Shinn, J. Jiravanichpaisal, D. Griffiths, et al. (2018), "Effect of biofloc on the survival of whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931, when challenged with a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease", *Asian Fish*, **31S**, pp.210-225, DOI: 10.33997/j.afs.2018.31.S1.015.
- [2] V. Kumar, S. Roy, B.K. Behera, et al. (2021), "Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture", *Toxins*, **13**(8), DOI: 10.3390/toxins13080524.
- [3] P. Li, L.N. Kinch, A. Ray, et al. (2017), "Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires", *Applied and Environmental Microbiology*, **83**(13), DOI: 10.1128/AEM.00737-17.
- [4] H.M. Santos, C.Y. Tsai, K.R.A. Maquiling, et al. (2020), "Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): A review", *Aquaculture International*, **28**(1), pp.169-185, DOI: 10.1007/s10499-019-00451-w.
- [5] M.M.M. Hossain, M.I. Uddin, H. Islam, et al. (2020), "Diagnosis, genetic variations, virulence, and toxicity of AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*", *Aquaculture International*, **28**(6), pp.2531-2546, DOI: 10.1177/11779322221136002.
- [6] Y. Hu, F. Li, Y. Zheng, et al. (2020), "Isolation, molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic products in the southern Fujian coast, China", *J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**(6), pp.856-867, DOI: 10.4014/jmb.2001.01005.
- [7] N. O'Boyle, A. Boyd (2022), "Validation of a random *Vibrio parahaemolyticus* genomic library by selection of quinolone resistance in a heterologous host", *Microbiology*, **168**(5), DOI: 10.1099/mic.0.001189.
- [8] J. Velazquez-Roman, N. León-Sicairos, L. de Jesus Hernández-Díaz, et al. (2014), "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3**, DOI: 10.3389/fcimb.2013.00110.
- [9] F. Israr, F. Hassan, B.S. Naqvi, et al. (2012), "Report: Studies on antibacterial activity of some traditional medicinal plants used in folk medicine", *Pak. J. Pharm. Sci.*, **25**(3), pp.669-674.
- [10] A. Kharisma, W. Tjahjaningsih, S. Sigit (2020), "Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of ketapang (*Terminalia catappa*) leaves extract against *Vibrio harveyi*", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **441**, DOI: 10.1088/1755-1315/441/1/012012.
- [11] I. Mueller-Harvey (2001), "Analysis of hydrolysable tannins", *Animal Feed Science and Technology*, **91**(1-2), pp.3-20, DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00227-9.
- [12] N. Chansue, N. Assawawongkasem (2011), "The *in vitro* antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian almond leaves (*Terminalia catappa* Linn.)", *KKU Veterinary Journal*, **18**(1), pp.36-45.
- [13] M. Sarfarazi, S.M. Jafari, G. Rajabzadeh (2015), "Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology", *Food Analytical Methods*, **8**(9), pp.2273-2285, DOI: 10.1007/s12161-014-9995-3.
- [14] C. Liyana-Pathirana, F. Shahidi (2005), "Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology", *Food Chemistry*, **93**(1), pp.47-56, DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.050.
- [15] E.M. Silva, H. Rogez, Y. Larondelle (2007), "Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology", *Separation and Purification Technology*, **55**(3), pp.381-387, DOI: 10.1016/j.seppur.2007.01.008.
- [16] D.C. Montgomery, G.C. Runger (2003), *Applied Statistics and Probability for Engineers*, John Wiley and Sons, Inc., 790pp.
- [17] D. Bas, I.H. Boyac (2007), "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology", *Journal of Food Engineering*, **78**(3), pp.836-845, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- [18] W.S. Laitonjam, R. Yumnam, S.D. Asem, et al. (2013), "Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T. Anderson and *Phlogacanthus jenkinsii* CB Clarke leaves", *Indian Journal of Natural Products and Resources*, **4**(1), pp.67-72.
- [19] N.T.H. Nhi (2020), "Antibacterial activity of Moringa extract against *Vibrio* spp. causes disease in whiteleg shrimp under *in vitro* conditions", *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, **5**(114), pp.77-81 (in Vietnamese).
- [20] I.S. Che Sulaiman, M. Basri, H.R. Fard Masoumi, et al. (2017), "Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology", *Chemistry Central Journal*, **11**(1), pp.1-11, DOI: 10.1186/s13065-017-0285-1.
- [21] N. Medina-Torres, T. Ayora-Talavera, H. Espinosa-Andrews, et al. (2017), "Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources", *Agronomy*, **7**(3), DOI: 10.3390/agronomy7030047.
- [22] R. Tabaraki, A. Nateghi (2011), "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology", *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**(6), pp.1279-1286, DOI: 10.1016/j.ultrsonch.2011.05.004.