

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.126

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO CHIẾT GIÀU POLYPHENOL VÀ FLAVONOID CÓ HOẠT KHÁNG VI KHUẨN *Vibrio* spp. TỪ LÁ CÂY NÚC NÁC (*Oroxylum indicum* L.)

Võ Thị Tú Anh, Trần Chí Linh, Đỗ Minh Kha và Đái Thị Xuân Trang*

Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đái Thị Xuân Trang (email: dtxtrang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 03/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 23/05/2022

Ngày duyệt đăng: 06/06/2022

Title:

Optimization of the extraction process of extracts rich in polyphenols and flavonoids with antibacterial activity against *Vibrio* spp. from the leaves of *Oroxylum indicum* L.

Từ khóa:

Flavonoid, kháng khuẩn, núc nác, polyphenol, tối ưu, *Vibrio* spp.

Keywords:

Antibacterial, flavonoids, optimization, *Oroxylum indicum* L., polyphenols, *Vibrio* spp.

ABSTRACT

Response surface methodology was applied to examine the influence of the extraction parameters on the total polyphenols content (TPC), and total flavonoids content (TFC) of extracts from *Oroxylum indicum* L. leaves (OIL). The optimal conditions for TPC and TFC included the ultrasonic temperature of 59°C, the ethanol concentration of 69%, the ultrasonic time of 11 min, and the material/the solvent ratio of 1/25 (w/v). The verification of the experimental process was done at the previously defined optimal conditions. The experimental values (TPC=215.47±1.03 mg GAE/g extract; TFC=158.01±1.12 mg QE/g extract) showed good agreement with the predicted the values (TPC=214.09 mg GAE/g extract; TFC=158.77 mg QE/g extract). The antibacterial activity of the OIL optimal extract was investigated against five strains of *Vibrio* spp. (VC-1, VC-2, VC-3, VC-4, and VC-5). The OIL optimal extract exhibited strong antibacterial activity against *Vibrio* spp, with the minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 320 to 640 µg/mL. The study results also showed that the minimum bactericidal concentration (MBC) of the OIL optimal extract ranged from 640 to 1280 µg/mL.

TÓM TẮT

Phương pháp đáp ứng bề mặt được áp dụng để kiểm tra ảnh hưởng của các yếu tố chiết xuất đến hàm lượng polyphenol (TPC) và flavonoid (TFC) trong lá núc nác (LNN). Điều kiện tối ưu được xác định để chiết xuất TPC và TFC là: nhiệt độ 59°C, ethanol 69%, thời gian 11 phút và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/25 (w/v). Quá trình chiết xuất được xác minh ở các điều kiện tối ưu đã được xác định. Các giá trị thực nghiệm (TPC=215,47±1,03 mg GAE/g cao chiết; TFC=158,01±1,12 mg QE/g cao chiết) cho thấy sự phù hợp tốt với giá trị dự đoán (TPC=214,09 mg GAE/g cao chiết; TFC=158,77 mg QE/g cao chiết). Hoạt tính kháng khuẩn của cao tối ưu LNN được nghiên cứu chống lại năm chủng *Vibrio* spp. (VC-1, VC-2, VC-3, VC-4, và VC-5). Cao tối ưu LNN có hoạt tính kháng khuẩn mạnh chống lại *Vibrio* spp. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao tối ưu LNN dao động từ 320 đến 640 µg/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao tối ưu LNN dao động từ 640 đến 1280 µg/mL.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, giống *Vibrio* đang trở thành tâm điểm trong nuôi trồng thủy sản, hầu hết các loài thuộc giống vi khuẩn này đều là những tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên tôm, cá. Vi khuẩn *Vibrio vulnificus* gây bệnh nhiễm khuẩn máu cá chình (Elgendy et al., 2016); vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* là tác nhân gây ra hội chứng tôm chết sớm (Early Mortality Syndrome-EMS), hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome-AHPNS) (Santos et al., 2020), bệnh phát sáng ở ấu trùng tôm sú và các vấn đề ngộ độc thực phẩm trên người; Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng (Liu et al., 2004). Sự bùng phát dịch bệnh liên quan đến sự gia tăng tỷ lệ các loài *Vibrio* gây bệnh trong nước ao nuôi (Sung et al., 2001). Ngoài ra, hơn hàng chục loài vi khuẩn thuộc giống *Vibrio* là nguyên nhân gây bệnh trên người (Austin et al., 2005; Scallan et al., 2011). Các bệnh này thường liên quan đến việc ăn hải sản chưa nấu chín, sử dụng nguồn nước nhiễm khuẩn hoặc tiếp xúc vết thương hở với môi trường nhiễm khuẩn (Dechet et al., 2008). Các loài *Vibrio* gây ngộ độc thực phẩm ở người bao gồm *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. mimicus* (Cazorla et al., 2011; Newton et al., 2012). Do những đặc tính gây độc này, *Vibrio* spp. là một trong những đối tượng đã và đang được quan tâm trong các nghiên cứu tìm vật liệu kháng khuẩn mới.

Thực vật là nguồn nguyên liệu phong phú cho các nghiên cứu tìm các hoạt chất kháng khuẩn tiềm năng (Yaquba et al., 2020). Nhiều loài thực vật đã được chứng minh có nhiều hợp chất với hoạt tính sinh học đa dạng khác nhau: kháng oxy hóa, kháng viêm và kháng ung thư (Wu, 2002). Cây núc nác (*Oroxylum indicum* L.) là một trong những loài thực vật đã được chứng minh các đặc tính sinh học này (Trang và ctv., 2019). Trong y học dân gian, cây núc nác có tác dụng kháng viêm, trị ngứa, chữa kiết lỵ, tiêu chảy, ho, đau vú, mụn nhọt, sỏi đậu, sốt phát ban, viêm gan, đau mắt đỏ, eczema, chàm hóa các nốt sần, viêm da cơ địa, tổ đũa, á sừng (Lợi, 2006). Thành phần hóa học của cây núc nác đã được công bố, bao gồm các hợp chất có hoạt tính sinh học như: polyphenol (TPC), flavonoid (TFC), tannin, alkaloid (Trang và ctv., 2019). Qua các nghiên cứu về hoạt tính sinh học, có thể thấy tất cả các bộ phận của cây núc nác đều sở hữu giá trị dược liệu như: kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng nấm, kháng viêm, kháng ung thư và kháng đái tháo đường *in vitro* (Trang và ctv., 2019; Trang và ctv., 2020). Các hoạt tính sinh học của cây núc nác có liên quan mật

thiết đến hàm lượng TPC (Total Phenolic Content - TPC) và hàm lượng TFC (Total Flavonoid Content - TFC) (Trang và ctv., 2019). Việc xác định điều kiện ly trích tối ưu sao cho đạt được hàm lượng cao polyphenol và flavonoid trong cao chiết núc nác là cần thiết, có ý nghĩa thực tiễn cho các nghiên cứu tiếp trong việc phát triển vật liệu kháng khuẩn từ tự nhiên.

TPC và TFC trong quá trình ly trích có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau. Trong đó, dung môi, thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được xem là những yếu tố chính ảnh hưởng đến TPC và TFC. Trong tình huống này, khi có nhiều biến ảnh hưởng đến quá trình ly trích thì phương pháp luận bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology, RSM) là một kỹ thuật phù hợp để tối ưu hóa quy trình ly trích (Bas & Boyaci, 2007). RSM là một phương pháp để thiết kế các thí nghiệm thống kê, mô hình hóa các quá trình, xác minh ý nghĩa thống kê của các biến độc lập và được sử dụng để đạt được các điều kiện hoạt động tối ưu trong nhiều nghiên cứu ly trích (Sarfarazi et al., 2015). 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. Nó là một giải pháp thay thế quan trọng để tránh các thí nghiệm tốn thời gian. Do đó, Box-Behnken được áp dụng rộng rãi trong các quy trình ly trích một chất hoặc nhóm chất từ nguyên liệu thực vật cụ thể (Sun et al., 2010; Shao et al., 2011; Sheng et al., 2013).

Trong nghiên cứu này, mô hình Box-Behnken được sử dụng trong việc tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao chiết giàu TPC và TFC từ lá cây núc nác. Trong đó, các cao chiết thu được có hàm lượng TPC và TFC cao, có hiệu quả kháng khuẩn hiệu quả trên các dòng vi khuẩn *Vibrio* được phân lập từ gan tụy của tôm bệnh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá cây núc nác được thu tại núi Cẩm, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang. Năm dòng vi khuẩn *Vibrio* spp. được ký hiệu lần lượt là VC-1, VC-2, VC-3, VC-4 và VC-5. Các dòng vi khuẩn này được phân lập từ mẫu tôm thẻ chân trắng nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Mẫu tôm bệnh được cung cấp từ Công ty trách nhiệm hữu hạn Phát triển Khoa học Quốc tế Trường Sinh, chi nhánh tại tỉnh Sóc Trăng. Vi khuẩn được phân lập trên môi trường chọn lọc TCBS agar (Thiosulfate-Citrate Bile-Sucrose Agar) tại phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Phát triển Dược liệu, Bộ

môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát trên môi trường LB agar (Luria Bertani Agar).

Hóa chất: Azithromycin (Siam Agriculture Marketing, Thailand), ethanol (Cemaco), Na_2CO_3 (Xilong), gallic acid (Merck), quercetin (Merck), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck), NaNO_2 (Xilong), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Xilong), dimethyl sulfoxide (Merck), Luria Bertani broth (Himedia, Ấn Độ), Thiosulfate-Citrate Bile-Sucrose Agar (Himedia, Ấn Độ) và resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu

Lá núc nác (LNN) tươi (3.750 g) được rửa sạch và sấy khô ở 60°C . LNN khô được xay nhuyễn thành bột dược liệu (890 g). Độ ẩm trong mẫu bột dược liệu LNN là $7,34 \pm 0,21\%$, được xác định dựa theo hướng dẫn của Dược điển Việt Nam V (Bộ Y Tế, 2017). Bột dược liệu đạt tiêu chuẩn có độ ẩm $\leq 9\%$ sẽ được trữ lại và sử dụng trong các khảo sát tiếp theo.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến quá trình ly trích TPC và TFC

Nhiệt độ siêu âm: Bột dược liệu LNN được ngâm trong ethanol 90% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đánh siêu với tần số cố định là 40 kHz bằng máy rửa siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, Trung Quốc) trong 5 phút ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau từ 30, 40, 50, 60, 70, 80 đến 90°C .

Thời gian siêu âm: Bột dược liệu LNN được ngâm trong ethanol 90% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đánh siêu với tần số cố định là 40 kHz bằng máy rửa siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, Trung Quốc) ở 30°C trong thời gian từ 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35 phút.

Nồng độ ethanol: Bột dược liệu LNN được ngâm trong ethanol có nồng độ từ 40, 50, 60, 70, 80, 90 đến 99,5% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đánh siêu với tần số cố định là 40 kHz bằng máy rửa siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, Trung Quốc) ở 30°C trong thời gian 5 phút.

Tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi: Bột dược liệu LNN được ngâm trong ethanol 90% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt từ 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35 đến 1/40 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đánh siêu với tần số cố định là 40 kHz bằng máy rửa siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, Trung Quốc) ở 30°C trong thời gian 5 phút.

Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc và tiến hành cô đuổi dung môi để thu lấy cao chiết. Các cao chiết sẽ được sử dụng để định lượng TPC và TFC theo mô tả trong mục 2.2.4.

2.2.3. Xây dựng quy trình ly trích tối ưu TPC và TFC

Dựa trên kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến TPC và TFC, các yếu tố đơn có ảnh hưởng đến TPC và TFC được chọn vào trong khảo sát tối ưu. Phần mềm Design expert 11.0 được sử dụng với mô hình Box-Behnken. Tổng số nghiệm thức là 17 (5 nghiệm thức trung tâm). Biến độc lập được dự kiến khảo sát là nhiệt độ ly trích, thời gian ly trích, nồng độ ethanol hoặc tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi. Biến phụ thuộc là TPC và TFC. Sau khi đã thực hiện các nghiệm thức mà mô hình thí nghiệm đưa ra, cao chiết thu được từ các nghiệm thức sẽ được tiến hành định lượng TPC và TFC. Đồng thời, các điều kiện nhiệt độ, thời gian, dung môi và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi tối ưu được kiểm chứng tổ hợp như mô hình thiết kế đưa ra.

2.2.4. Phương pháp định lượng TPC và TFC

Định lượng TPC tổng bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu

TPC được xác định theo phương pháp của Singleton et al. (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μL cao chiết pha trong 250 μL nước và 250 μL thuốc thử Folin-Ciocalteu rồi lắc đều. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào 250 μL Na_2CO_3 10% rồi ủ 30 phút ở 40°C trong bể ổn nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nM. Gallic acid được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. TPC trong các cao dược liệu được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid (GAE).

Phương pháp định lượng TFC

TFC được xác định bằng phương pháp so màu AlCl_3 của Sultana et al. (2007) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL cao dược liệu pha trong 1 mL nước rồi lắc đều. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được thêm vào 200 μL NaNO_2 5%, sau 5 phút tiếp tục thêm 200 μL AlCl_3 10%, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút sẽ được thêm 2 mL NaOH 1 M. Cuối cùng, nước được thêm vào cho đủ 5 mL và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nM. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. TFC toàn phần trong các cao dược liệu được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin (QE).

2.2.5. Khảo sát khả năng kháng một số dòng vi khuẩn *Vibrio spp.*

Sau khi đã xác định được điều kiện chiết xuất cao chiết chứa TPC và TFC tối ưu (phương pháp chiết, nhiệt độ, thời gian, dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu), các điều kiện này sẽ được áp dụng trong quá trình ly trích cao chiết ưu LNN. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết được tiếp tục khảo sát trên một số dòng vi khuẩn *Vibrio spp.*

Phương pháp phân lập vi khuẩn *Vibrio spp.*

Mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính cung cấp từ Công ty trách nhiệm hữu hạn Phát triển Khoa học Quốc tế Trường Sinh (Sóc Trăng) được sử dụng làm nguồn phân lập vi khuẩn. Tôm bệnh được giải phẫu tách lấy 0,1 g gan, tụy cho vào ống eppendorf vô trùng chứa 900 μ L nước muối sinh lý 0,85% và nghiền. Sau đó, 100 μ L dung dịch mẫu được trải đều trên nền môi trường TCBS agar. Sau đó, các đĩa petri được ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian từ 24 đến 48 giờ. Các khuẩn lạc có hình thái đặc trưng: tròn, lồi hoặc lõm, đường kính từ 0,5 đến 3 mm, màu xanh hay vàng lần lượt được cấy ria sang các đĩa petri chứa môi trường TCBS agar. Mẫu tiếp tục được ủ ở nhiệt độ 30°C, quan sát sự phát triển của khuẩn lạc trong 24 giờ và tiếp tục cấy chuyển trên môi trường TCBS agar cho đến khi thu được các dòng vi khuẩn *Vibrio spp.* thuần chủng (Duy và ctv., 2019). Các dòng vi khuẩn *Vibrio spp.* sẽ được ghi nhận đặc điểm hình thái khuẩn lạc (hình dạng, kích thước, màu sắc, dạng bia, độ nổi) và gửi mẫu giải trình tự gene 16S rRNA tại Công ty trách nhiệm hữu hạn thương mại và dịch vụ Nam Khoa (địa chỉ: 793/58, Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, quận 7, thành phố Hồ Chí Minh) bằng đoạn mồi của Sun et al. (2009) sử dụng:

5'-TGGATGTAATGAGTTTGG-3';
5'-CGTTACGATTATTTGATAG-3'.

Các dòng vi khuẩn *Vibrio spp.* được ký hiệu như sau: *Vibrio sp.* VC-x với VC: Vĩnh Châu, x: thứ tự dòng vi khuẩn phân lập.

Xác định khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio spp.* của cao chiết ưu LNN

Khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* của cao chiết LNN giàu TPC và TFC được xác định dựa trên sự hình thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ cao chiết. 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 μ L. Các đĩa petri chứa vi khuẩn được đục lỗ tạo giếng thạch có đường kính 7 mm, sau đó, 50 μ L cao chiết tối ưu LNN 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 (Ngan et al., 2012).

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

Các giá trị MIC và MBC được xác định dựa vào chất chỉ thị màu resazurin. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng, mỗi giếng chứa hỗn hợp 50 μ L cao chiết ưu LNN và 50 μ L dịch vi khuẩn (mật số tương đương 10^6 CFU/mL). Các giếng đối chứng chứa hỗn hợp dịch vi khuẩn, môi trường nuôi cấy và DMSO 10%. Tất cả các giếng thử nghiệm được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, 20 μ L thuốc thử resazurin 0,01% được cho vào mỗi giếng. Nồng độ cao chiết thấp nhất mà thuốc thử resazurin vẫn có màu xanh được ghi nhận là nồng độ ức chế tối thiểu MIC (μ g/mL). Ở các giếng không có sự đổi màu của resazurin (các giếng có màu xanh), 10 μ L dịch thử nghiệm được nhỏ lên các đĩa môi trường LB. Các đĩa thạch được ủ ở 30°C trong 24 giờ. Nồng độ cao chiết thấp nhất mà không xuất hiện khuẩn lạc tại vị trí nhỏ giọt được xác định là nồng độ (μ g/mL) diệt khuẩn tối thiểu (MBC) (Ngan et al., 2012).

Trong các thử nghiệm kháng khuẩn ở trên, thuốc thương mại Azithromycin (là thuốc chuyên dùng điều trị bệnh trên thủy sản do *Vibrio spp.*) được sử dụng làm đối chứng dương. Giá trị MBC và MIC của cao chiết ưu LNN được so sánh với hoạt tính của Azithromycin và cao chiết ưu LNN. Cao chiết ưu LNN là cao chiết được chiết xuất trong điều kiện chưa tối ưu, có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, sử dụng ethanol 90% (v/v), nhiệt độ chiết 30°C, thời gian siêu âm 5 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v). Trong phạm vi bài viết, cao chiết ưu LNN được gọi là cao LNN.

2.2.6. Xử lý và phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được trình bày dưới dạng MEAN \pm SEM. Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA (kiểm định Tukey's) bằng phần mềm Minitab 16.0. và tối ưu hóa mô hình ly trích bằng phần mềm Design expert 11.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

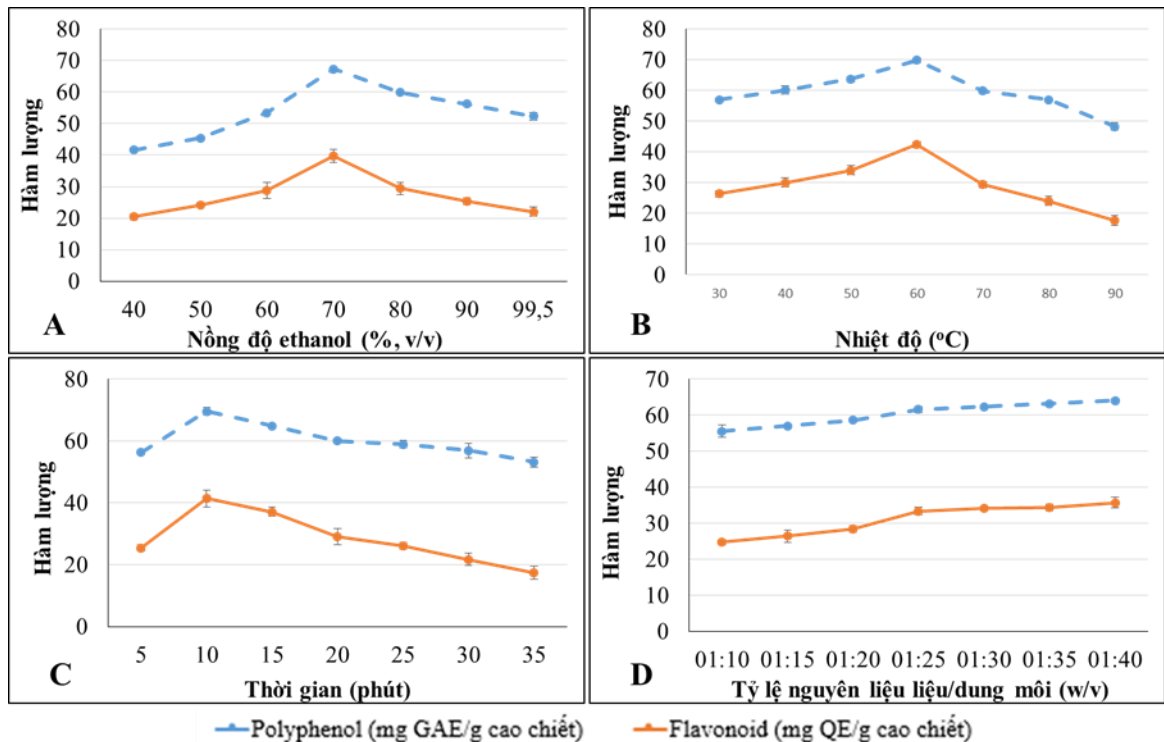
3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến TPC và TFC

Kết quả trình bày trong Hình 1A cho thấy, sự kết hợp giữa dung môi ethanol và nước có ảnh hưởng đáng kể đến TPC và TFC. Cụ thể, TPC tăng từ 41,58 \pm 0,57 mg GAE/g ở nồng độ ethanol 40% đến

67,38±0,43 mg GAE/g cao chiết ở nồng độ ethanol 70%. Tương tự như polyphenol, TFC ly trích được từ LNN cũng tăng liên tục từ 20,40±1,00 mg QE/g cao chiết ở nồng độ ethanol 40% đến 39,73±2,08 mg QE/g cao chiết ở nồng độ ethanol 70%. TPC và TFC đồng thời giảm khi nồng độ ethanol vượt quá 70%. Điều này chứng tỏ rằng, các dạng TPC và TFC trong LNN hòa tan nhiều trong dung môi ethanol 70%. Do đó, dung môi ethanol có nồng độ từ 60% đến 80% đã được chọn cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

Từ kết quả của nhiều nghiên cứu, có thể chứng minh, tốc độ chuyển động của phân tử, tốc độ khuếch tán và hòa tan của các hợp chất tăng nhanh khi tăng nhiệt độ siêu âm. Sự gia tăng nhiệt độ phù hợp có thể làm tăng hiệu quả ly trích do làm giảm độ nhớt, tăng khả năng thâm thấu của dung môi vào tế bào, tăng khả năng hòa tan với hệ số khuếch tán

của các hợp chất được ly trích (Zhang et al., 2018). Tuy nhiên, các hợp chất thuộc nhóm TPC và TFC cũng rất dễ bị oxy hóa hay bị phân hủy ở nhiệt độ ly trích không thích hợp (Zhang et al., 2018). Nhiệt độ ly trích mang lại cả hai tác động tăng cường và giảm thiểu hiệu suất quá trình trích ly. Dựa vào kết quả trình bày trong Hình 1B, nhiệt độ siêu âm được xác định có ảnh hưởng đáng kể đáng kể đến TPC và TFC. Cụ thể như sau: TPC và TFC tăng khi nhiệt độ siêu âm tăng liên tục từ 30°C đến 60°C. TPC tăng từ 57,04±0,37 ở 30°C đến 69,88±0,77 mg GAE/g cao chiết ở 60°C. Trong khi đó, TFC tăng từ 26,40±1,00 ở 30°C đến 42,40±1,00 mg QE/g cao chiết ở 60°C. Tuy nhiên, TPC và TFC bắt đầu giảm ở 70°C. Từ kết quả này cho thấy, nhiệt độ cao sẽ làm giảm TPC và TFC (Sheng et al., 2013; Wang et al., 2017). Do đó, phạm vi nhiệt độ siêu âm từ 50°C đến 70°C đã được chọn cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo trong phần tối ưu hóa quy trình.



Hình 1. Hàm lượng TPC (mg GAE/g cao chiết) và TFC (mg QE/g cao chiết) được ly trích ở các điều kiện khác nhau từ LNN

Ghi chú: A-Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến TPC và TFC; B-Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến TPC và TFC; C-Ảnh hưởng của nhiệt độ đến TPC và TFC; D-Ảnh hưởng của thời gian đến TPC và TFC

Thời gian siêu âm là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến TPC và TFC trong quá trình ly trích (Md Yusof et al., 2019). Qua Hình 1C, có thể thấy, thời gian siêu âm có tác động đáng kể đến TPC và TFC. Khi thay đổi biến độc lập (thời gian siêu

âm) từ 5 phút đến 35 phút, biến phụ thuộc (TPC và TFC) đạt mức tối đa trong một khoảng thời gian ngắn (10 phút). Sau đó, biến phụ thuộc giảm khi kéo dài thời gian siêu âm. Cụ thể, sau 10 phút siêu âm, TPC đạt 69,61±1,19 mg GAE/g cao chiết và sau đó

giảm liên tục xuống còn 53,19±1,61 mg GAE/g cao chiết ở 35 phút. TFC thu được sau 5 phút siêu âm là 25,40±1,00 mg QE/g cao chiết tăng lên 41,40±2,65 mg QE/g cao chiết sau 10 phút siêu âm. Tương tự như TPC, TFC có xu hướng giảm dần khi tăng thời gian siêu âm. Có thể nhận định, các hợp chất thuộc nhóm TPC và TFC được giải phóng nhanh chóng trong một thời gian ngắn thực hiện siêu âm. Ngoài ra, các hợp chất thuộc nhóm TPC và TFC có thể bị phân hủy và tạo nhũ tương khi kéo dài thời gian siêu âm (Lai et al., 2014; Tomaz et al., 2016). Do đó, thời gian siêu âm trong khoảng thời gian từ 5 đến 15 phút đã được chọn cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

Trong các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ly trích, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có liên quan đến diện tích tiếp xúc giữa vật liệu và dung môi, từ đó có ảnh hưởng đến việc ly trích TPC và TFC. Hình 1D cho thấy, TPC và TFC ly trích từ LNN tăng lên khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi. TPC và TFC tăng dần từ tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:10 (w/v) đến 1:25 (w/v), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05). Sau đó, TPC, TFC ly trích được với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:25 đến 1:40 (w/v) thay đổi không đáng kể (p>0,05). Những kết quả này chứng minh rằng bột dược liệu LNN được phân tán hoàn toàn trong dung môi ethanol với tỷ lệ nguyên

liệu/dung môi cao, do đó diện tích tiếp xúc lớn hơn để tăng cường quá trình ly trích. Tuy nhiên, khi thể tích ethanol tăng liên tục, diện tích tiếp xúc đạt đến độ bão hòa làm cho TPC và TFC thu được không thay đổi nhiều (Tabaraki and Nateghi, 2011). Do đó, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi được chọn cố định là 1/25 (w/v) để khảo sát cho các thử nghiệm tối ưu hóa.

3.2. Kết quả tối ưu hóa quy trình chiết xuất TPC và TFC từ LNN

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện ly trích TPC và TFC bằng phương pháp chiết siêu âm, có thể thấy, nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian siêu âm là những yếu tố có ảnh hưởng nhiều đến quá trình ly trích TPC và TFC trong bột dược liệu LNN. Phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế thí nghiệm Box-Behnken với ba biến, ba cấp độ được sử dụng để xây dựng quy trình tối ưu hóa ly trích TPC và TFC từ bột dược liệu LNN.

Kết quả trong Bảng 1 cho thấy các nghiệm thức trung tâm (nghiệm thức 13 đến 17) đều cho TPC, TFC cao hơn, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức còn lại. Trong đó, TPC (213,80±0,21 mg GAE/g cao chiết) và TFC (159,07±4,93 mg QE/g cao chiết) ở nghiệm thức 17 là cao nhất.

Bảng 1. Kết quả thực nghiệm, dự đoán hàm lượng TPC và TFC

Nghiệm thức	Các biến độc lập			Hàm lượng TPC (mg GAE/g cao chiết)		Hàm lượng TFC (mg QE/g cao chiết)	
	A (% v/v)	B (°C)	C (phút)	Thực nghiệm	Dự đoán	Thực nghiệm	Dự đoán
1	60	50	10	116,02 ^g ±1,90	116,56	86,40 ^e ±1,00	86,61
2	80	50	10	123,19 ^f ±0,74	123,36	91,07 ^{de} ±1,53	91,19
3	60	70	10	101,21 ^h ±1,30	101,04	75,40 ^f ±1,00	75,28
4	80	70	10	82,81 ⁱ ±0,98	82,27	60,73 ^g ±1,53	60,52
5	60	60	5	138,12 ^d ±1,30	137,83	102,07 ^c ±2,08	102,07
6	80	60	5	131,95 ^e ±0,93	132,03	96,40 ^{cd} ±2,00	96,48
7	60	60	15	163,80 ^b ±1,54	163,72	120,40 ^b ±2,65	120,32
8	80	60	15	157,26 ^c ±1,11	157,55	115,73 ^b ±4,16	115,73
9	70	50	5	118,86 ^g ±0,93	118,61	87,73 ^{de} ±2,08	87,53
10	70	70	5	80,59 ⁱ ±0,74	81,05	60,07 ^g ±1,53	60,20
11	70	50	15	135,53 ^{de} ±0,77	135,07	100,07 ^c ±4,04	99,95
12	70	70	15	115,78 ^g ±1,61	116,02	85,07 ^e ±3,21	85,28
13	70	60	10	212,07 ^a ±2,22	212,00	158,73 ^a ±2,52	157,27
14	70	60	10	211,58 ^a ±1,13	212,00	156,07 ^a ±2,31	157,27
15	70	60	10	210,72 ^a ±0,43	212,00	155,73 ^a ±3,21	157,27
16	70	60	10	211,83 ^a ±1,50	212,00	156,73 ^a ±4,51	157,27
17	70	60	10	213,80 ^a ±0,21	212,00	159,07 ^a ±4,93	157,27

Ghi chú: A-Nồng độ ethanol (% v/v); B-Nhiệt độ (°C); C-Thời gian siêu âm (phút). Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Dựa vào các giá trị thu nhận được từ Bảng 1, phần mềm Design Expert 11.0 được sử dụng để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được mô hình dự đoán của ba yếu tố mà tại đó TPC và TFC là cao nhất. Phương pháp được áp dụng là phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai dự đoán TPC và TFC như sau:

$$Y_{\text{Polyphenol}} = -4321,7405 + 53,32335 \times A + 86,90342 \times B + 20,07795 \times C - 0,063925 \times A \times B - 0,00185 \times A \times C + 0,0926 \times B \times C - 0,35549 \times A^2 - 0,706415 \times B^2 - 1,14666 \times C^2.$$

$$Y_{\text{Flavonoid}} = -3216,446 + 40,01245 \times A + 64,2701 \times B + 15,2394 \times C - 0,04835 \times A \times B + 0,005 \times A \times C + 0,0633 \times B \times C - 0,267255 \times A^2 - 0,521405 \times B^2 - 0,87562 \times C^2.$$

Trong đó, Y là TPC hoặc TFC dự đoán ly trích được từ LNN; A là yếu tố nồng độ ethanol (% v/v); B là yếu tố nhiệt độ (°C); C là yếu tố thời gian siêu âm (phút).

Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình thu được kết quả thể hiện trong Bảng 2. Phương trình hồi quy của TPC và TFC có dạng hàm bậc 2 và đạt được sự tương quan khá tốt với phân tích phương sai có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Điều này cho thấy, mô hình này phù hợp và có thể dự đoán chính xác

hàm mục tiêu nghiên cứu (TPC và TFC). Phương trình TPC và TFC cũng cho thấy các thông số có thể giải thích được sự thay đổi của hàm mục tiêu TPC (R²=0,9998) và TFC (R²=0,9995) với hệ số tương quan khá cao. Từ đó cho thấy sự tương quan mật thiết giữa TPC, TFC dự đoán và TPC, TFC thu nhận được trong thực tế. Nếu chỉ xét về hệ số tương quan R², một mô hình hồi quy đa biến theo phương pháp đáp ứng bề mặt được xem là tốt khi hệ số R² tối thiểu là 0,8; giá trị này thấp hơn nhiều so với R² của hàm mục tiêu TPC và TFC trong nghiên cứu này. Hơn nữa, giá trị của hệ số biến thiên (CV) của hàm mục tiêu TPC và TFC lần lượt là 0,65% và 1,07%, cho mô hình đề xuất nhỏ hơn 10% có độ chính xác và độ tin cậy của quá trình thử nghiệm cao (Chen et al., 2012). Các hệ số trong phương trình hồi quy của TPC và TFC đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05), ngoại trừ giá trị của hệ số thể hiện sự tương tác giữa nồng độ ethanol và thời gian siêu âm (AC) (p>0,05). Mô hình của TPC, TFC có dạng hàm bậc 2 hoàn toàn phụ thuộc vào các nhân tố độc lập như nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian siêu âm. Đồng thời, mô hình này còn có sự tương tác giữa nồng độ ethanol với nhiệt độ, giữa nhiệt độ với thời gian siêu âm và không có sự tương tác giữa nồng độ ethanol với thời gian siêu âm.

Bảng 2. Phân tích các hệ số tương quan của các yếu tố đến TPC và TFC

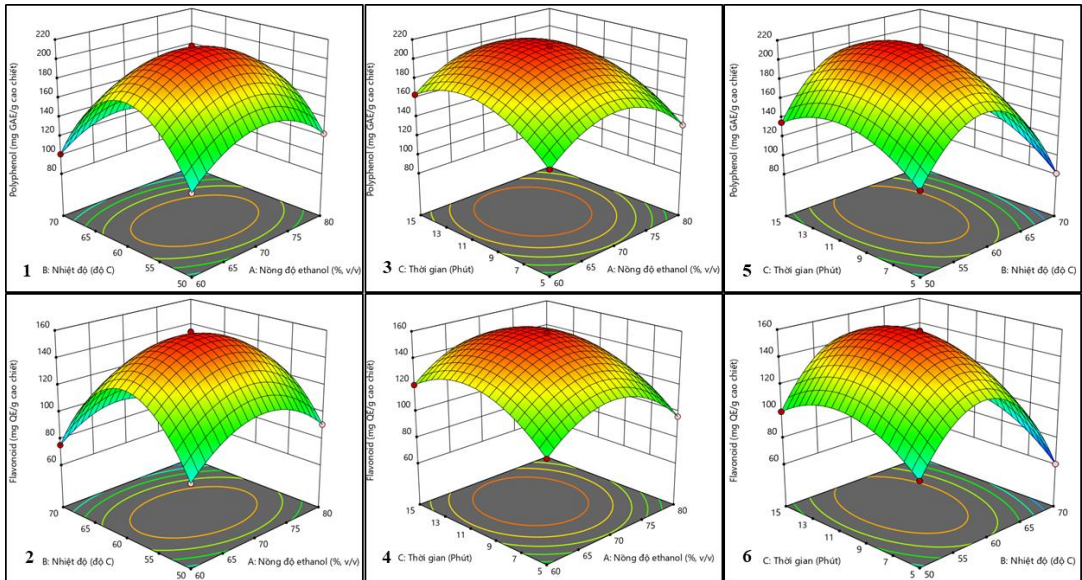
Nguồn	Phân tích ANOVA TPC					Phân tích ANOVA TFC				
	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value
Model	35827,25	9	3980,81	4297,73	<0,0001	19807,66	9	2200,85	1585,01	<0,0001
A	71,64	1	71,64	77,34	<0,0001	51,71	1	51,71	37,24	0,0005
B	1602,06	1	1602,06	1729,61	<0,0001	882,00	1	882,00	635,20	<0,0001
C	1322,27	1	1322,27	1427,53	<0,0001	703,13	1	703,13	506,38	<0,0001
AB	163,46	1	163,46	176,47	<0,0001	93,51	1	93,51	67,34	<0,0001
AC	0,0342	1	0,0342	0,0369	0,8530	0,2500	1	0,2500	0,1800	0,6841
BC	85,75	1	85,75	92,57	<0,0001	40,07	1	40,07	28,86	0,0010
A ²	5320,97	1	5320,97	5744,59	<0,0001	3007,38	1	3007,38	2165,86	<0,0001
B ²	21011,46	1	21011,46	22684,24	<0,0001	11446,87	1	11446,87	8243,83	<0,0001
C ²	3460,08	1	3460,08	3735,54	<0,0001	2017,66	1	2017,66	1453,08	<0,0001
Residual	6,48	7	0,9263			9,72	7	1,39		
Lack of Fit	1,37	3	0,4565	0,3570	0,7881	0,2451	3	0,0817	0,0345	0,9901
Pure Error	5,11	4	1,28	N=17	CV=0,65%	9,47	4	2,37	N=17	CV=1,07%
Cor Total	35833,73	16	R ² =0,9998	R ² _{Adj} =0,9996	R ² _{Pre} =0,9992	19817,38	16	R ² =0,9995	R ² _{Adj} =0,9989	R ² _{Pre} =0,9991

Ngoài ra, các biểu đồ bề mặt đáp ứng 3D được tạo ra bằng cách cố định một yếu tố ở mức 0, đồng thời thay đổi hai yếu tố khác trong phạm vi thăm dò. Các biểu đồ 3D này đã mô tả tác động tương tác của các yếu tố đến TPC, TFC như được hiển thị trong

Hình 2. Biểu đồ bề mặt đáp ứng giữa nhiệt độ và nồng độ ethanol được mô phỏng ở Hình 2.1 và Hình 2.2. Từ đây cho thấy, TPC và TFC bị ảnh hưởng bởi nồng độ ethanol và nhiệt độ; hàm lượng TPC và TFC bắt đầu giảm sau khi nồng độ ethanol đạt 70%,

nhệt độ đạt 60°C. Việc sử dụng hỗn hợp dung môi (ethanol và nước) có thể làm tăng TPC, TFC hoặc các hợp chất có độ phân cực cao nhất và thấp (Bucic-Kojić et al., 2007). Nhiệt độ siêu âm được kết hợp trong quá trình ly trích làm cho độ phân cực của dung môi có thể giảm và có thể phù hợp với hợp chất

mục tiêu. Vì thế, hỗn hợp dung môi ethanol và nước có thể cải thiện hiệu quả của quá trình ly trích và tăng diện tích tiếp xúc bề mặt cho dung môi và bột dược liệu (Mohd-Setapar et al., 2014). Từ kết quả Hình 2.3 đến Hình 2.6, có thể thấy, việc kéo dài thời gian ly trích dẫn đến việc giảm TPC, TFC trong cao LNN.

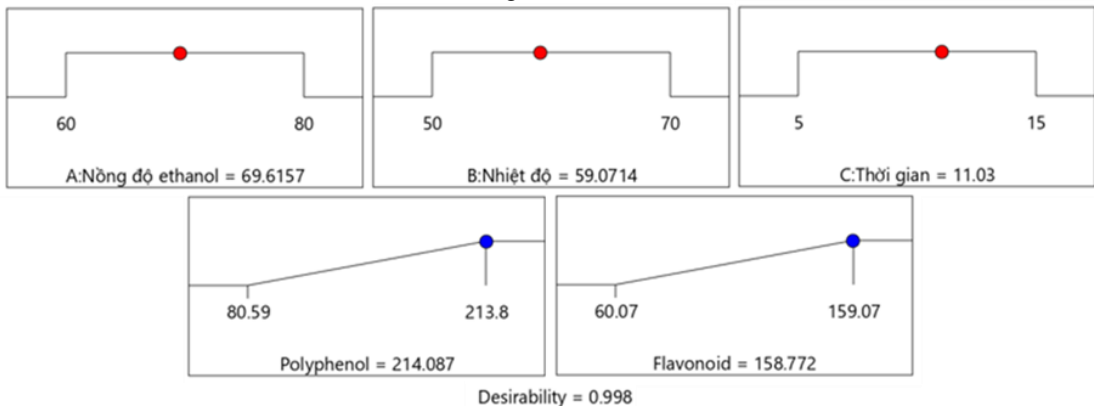


Hình 2. Bề mặt đáp ứng hàm lượng TPC và TFC ly trích từ LNN

Ghi chú: 1, 2-Mô hình tương tác giữa nhiệt độ và nồng độ ethanol ảnh hưởng đến TPC và TFC; 3, 4-Mô hình tương tác giữa thời gian và nồng độ ethanol ảnh hưởng đến TPC và TFC; 5, 6-Mô hình tương tác giữa thời gian và nhiệt độ ảnh hưởng đến TPC và TFC.

Dựa trên các kết quả phân tích trên, phương án tốt nhất được dự đoán để ly trích TPC, TFC từ LNN được trình bày trong Hình 3. Như vậy, TPC, TFC được ly trích tối ưu ở nồng độ ethanol 69,62%, nhiệt độ siêu âm là 59,07°C, thời gian siêu âm là 11,03 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/25 (w/v). Khi đó, TPC, TFC lần lượt đạt được là 214,09 mg

GAE/g cao chiết và 158,77 mg QE/g cao chiết. Từ kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm, TPC, TFC thu được lần lượt là 215,47±1,03 mg GAE/g cao chiết và 158,01±1,12 mg QE/g cao chiết, không khác biệt nhiều so với kết quả dự đoán. Cao chiết thu được là cao tối ưu LNN, được sử dụng cho các thí nghiệm sau.



Hình 3. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng TPC và TFC. 3.3. Kết quả phân lập và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao tối ưu LNN

3.2.1. Kết quả phân lập một số dòng vi khuẩn *Vibrio* spp.

Từ mẫu gan, tụy tôm bệnh, 5 dòng vi khuẩn *Vibrio* spp. được phân lập. Hình thái các dòng vi khuẩn này được trình bày trong Hình 4. Trong đó, các dòng vi khuẩn đã phân lập được khảo sát hình thái và giải trình tự gene 16S rRNA.

Dòng *Vibrio* sp. VC-1 (Hình 4A) là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, lồi, màu xanh (24 giờ cấy) và chuyển dần sang màu vàng (sau 48 giờ cấy), đường kính khuẩn lạc khoảng 1,1 mm và có tỷ lệ tương đồng 99,23% (16S rRNA) với dòng *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 33125.

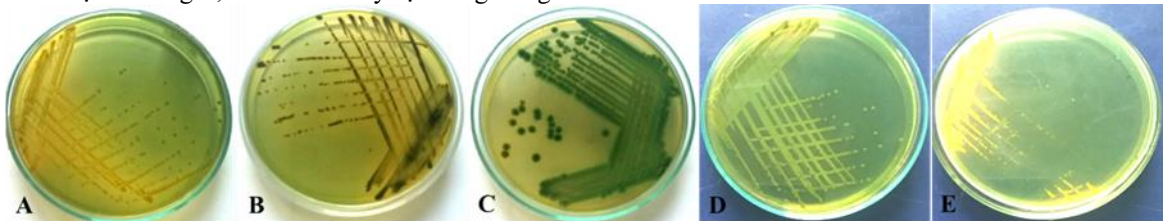
Dòng *Vibrio* sp. VC-2 (Hình 4B) là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, lồi, màu xanh (24 giờ cấy) và chuyển dần sang màu nâu (sau 48 giờ cấy), đường kính khuẩn lạc khoảng 1,1 mm và có tỷ lệ tương đồng

98,16% (16S rRNA) với dòng *Vibrio splendidus* ATCC 33125.

Dòng *Vibrio* sp. VC-3 (Hình 4C) là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, có khuẩn lạc tròn, bìa răng cưa, mô, màu xanh, đường kính khuẩn lạc khoảng 1,3-1,5 mm và có tỷ lệ tương đồng 99,61% (16S rRNA) với *Vibrio alginolyticus* FJV2.

Dòng *Vibrio* sp. VC-4 (Hình 4D) là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que dài, có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, lồi, màu vàng (24 giờ cấy) và dần chuyển sang màu xanh (sau 48 giờ cấy), đường kính khuẩn lạc khoảng 1,1 mm và có tỷ lệ tương đồng 99,71% (16S rRNA) với *Vibrio cholerae* TS15-B.

Dòng *Vibrio* sp. VC-5 (Hình 4E) là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, lồi, màu vàng, đường kính khuẩn lạc từ 0,9 đến 1,1 mm và có độ tương đồng 99,96% với *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 17802.



Hình 4. Hình thái các dòng vi khuẩn vi khuẩn *Vibrio* spp. trên môi trường TCBS

A: VC-1; B: VC-2; C: VC-3; D: VC-4; E: VC-5

3.2.2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio* spp.

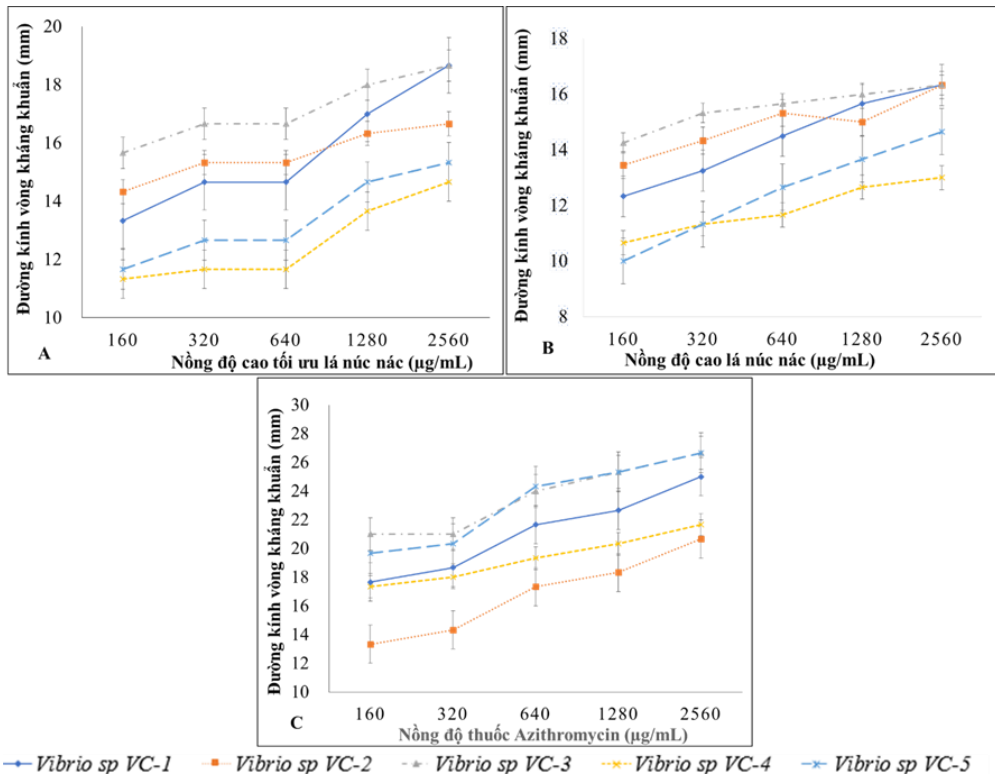
Hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. của cao tói ưu LNN được xác định dựa vào sự hình thành vòng kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán giếng thạch trình bày trong Hình 5. Cao tói ưu LNN tạo được đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ $10,00 \pm 0,57$ đến $18,66 \pm 0,57$ mm. Trong đó, với năm dòng vi khuẩn được khảo sát, cao tói ưu LNN thể hiện hoạt tính kháng mạnh nhất dòng VC-1 và khuẩn *Vibrio* sp. VC-3 với đường kính vòng kháng khuẩn là $18,66 \pm 0,57$ mm ở nồng độ 2560 $\mu\text{g/mL}$. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao tói ưu LNN luôn lớn hơn cao LNN, nhưng nhỏ hơn thuốc thương mại Azithromycin. Hoạt tính kháng khuẩn của cao ethanol của rễ và thân núc nác đã được khảo sát trên các dòng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* (Radhika et al., 2011). Trong đó, cao ethanol từ thân núc nác thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn so với cao ethanol rễ với đường kính vòng vô khuẩn đạt từ 15 đến 20 mm.

Cao chiết ethanol từ quả núc nác thu thập từ tỉnh Nakorn Pathom (Thái Lan) cho thấy khả năng kháng *Streptococcus suis* và *Staphylococcus intermedius* ở nồng độ 1000 mg/mL với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 14,39 mm và 15,11 mm (Sithisarn et al., 2016). Kết quả của nghiên cứu về LNN góp phần bổ sung dữ liệu về hoạt tính kháng khuẩn của cây núc nác, cũng như mở rộng đối tượng vi khuẩn khảo sát.

Nồng độ ức chế tối thiểu của cao tói ưu LNN đối với từng dòng vi khuẩn có sự khác nhau, được trình bày trong Bảng 3. Các giếng có sự đổi màu của thuốc thử resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của chất kháng khuẩn. Nồng độ này có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin). Các giếng không có sự đổi màu của resazurin được trải lên các đĩa môi trường thạch LB. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các cao chiết thực vật. Nồng độ này có thể

tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng, không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch. Như vậy, cao tảo ưu LNN có nồng độ ức chế tối thiểu là 320 µg/mL đối với 2 chủng VC-1, VC-5 và nồng

độ ức chế tối thiểu là 640 µg/mL đối với 3 chủng VC-2, VC-3, và VC-4. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao tảo ưu LNN đối với các dòng vi khuẩn thử nghiệm dao động từ 640 đến 1280 µg/mL.



Hình 5. Đường kính vòng kháng vi khuẩn *Vibrio* spp

Theo kết quả định lượng TPC và TFC, cao tảo ưu LNN có TPC, TFC cao hơn cao LNN (TPC=57,04±0,37 mg GAE/g cao chiết; TFC=26,40±1,00 mg QE/g cao chiết) lần lượt là 3,78 và 5,99 lần. Giá trị MIC và MBC của cao tảo ưu LNN thấp hơn cao LNN. Từ đó cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của cao tảo ưu LNN mạnh hơn cao LNN. Như vậy, khả năng kháng khuẩn của cao chiết

có thể chịu ảnh hưởng bởi TPC và TFC. Một số nhà nghiên cứu cho rằng các thành phần kháng khuẩn có trong cao chiết thực vật như TPC, TFC tương tác với các enzyme và protein của màng tế bào vi khuẩn gây ra sự phân tán của dòng proton về phía bên ngoài tế bào dẫn đến sự chết của tế bào hoặc có thể ức chế enzyme sinh tổng hợp amino acid của vi khuẩn (Burt, 2004; Gill and & Holley, 2006).

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Dòng vi khuẩn	MIC (µg/mL)			MBC (µg/mL)		
	Cao LNN	Cao tảo ưu LNN	Azithromycin	Cao LNN	Cao tảo ưu LNN	Azithromycin
VC-1	640	320	160	1280	640	320
VC-2	1280	640	160	>1280	1280	640
VC-3	640	640	160	1280	1280	640
VC-4	1280	640	80	>1280	1280	640
VC-5	1280	320	160	>1280	640	320

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., & Swings, J. (2005). Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental*

Microbiology, 7(9), 1488-1495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00847.x>

Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface

- methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Bộ Y Tế. (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cazorla, C., Guigon, A., Noel, M., Quilici, M.L., & Lacassin, F. (2011). Fatal *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters, new caledonia. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17(1), 136-137.
<https://doi.org/10.3201/eid1701.100603>
- Chen, G., Chen, J., Srinivasakannan, C., & Peng, J. (2012). Application of response surface methodology for optimization of the synthesis of synthetic rutile from titania slag. *Applied Surface Science*, 258(7), 3068-3073.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.039>
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005>
- Dechet, A. M., Yu, P. A., Koram, N., & Painter, J. (2008). Non-foodborne *Vibrio* infections: An important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997-2006. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 970-976.
<https://doi.org/10.1086/529148>
- Duy, H. K, Huê, T. N. Đ., & Trúc, L. T. T. (2019). Tình hình kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* spp. trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 4-2019(2019), 26-32.
<https://tapchi.ntu.edu.vn/docgia/tacgia-33448/baibao-270.html>
- Lợi, Đ. T. (2006). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
- Elgendy, M. Y., Kenawy, A. M., & El-Deen, A. E. N. (2016). *Gyrodactylus anguillae* and *Vibrio vulnificus* infections affecting cultured eel, *Anguilla anguilla*. *Communicata Scientiae*, 7(1), 1-11.
<https://doi.org/10.14295/CS.v7i1.1248>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1),1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>
- Lai, J., Wang, H., Wang, D., Fang, F., Wang, F., & Wu, T. (2014). Ultrasonic extraction of antioxidants from Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit using response surface methodology and their characterization. *Molecules*, 19(7), 9019-9032.
<https://doi.org/10.3390/molecules19079019>
- Liu, C. H., Cheng, W., Hsu, J. P., & Chen, J. C. (2004). *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1-2), 169-174.
<https://doi.org/10.3354/dao061169>
- Md Yusof, A. H., Abd Gani, S. S., Zaidan, U. H., Halmi, M., & Zainudin, B. H. (2019). Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from cocoa shells (*Theobroma cacao*) Using response surface methodology. *Molecules*, 24(4), 711.
<https://doi.org/10.3390/molecules24040711>
- Mohd-Setapar, S. H., Mohamad-Aziz, S. N., Chuong, C. S., Che Yunus, M. A., Ahmad Zaini, M. A., & Kamaruddin, M. J. (2014). A review of mixed reverse Micelle system for antibiotic recovery. *Chemical Engineering Communications*, 201, 1664-1685.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2013.819799>
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., & Mahon, B. E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: Review of surveillance data from 2 systems. *Clinical Infectious Diseases*, 54(05), S391-S395.
<https://doi.org/10.1093/cid/cis243>
- Ngan, L. T., Moon, J. K., Kim, J. H., Shibamoto, T., & Ahn, Y. J. (2012). Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1575-1583. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0961-6>
- Radhika, L. G., Meena, C. V., Peter, S., Rajesh, K. S., & Rosamma, M. P. (2011). Phytochemical and antimicrobial study of *Oroxylum indicum*. *Ancient science of life*, 30(4), 114-120.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22557440>
- Santos, H. M., Tsai, C. Y., Maquiling, K. R. A., Tayo, L. L., Mariatulqabtah, A. R., Lee, C. W., & Chuang, K. P. (2020). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquaculture International*, 28(1), 169-185.
<https://doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w>

- Sarfarazi, M., Jafari, S. M., & Rajabzadeh, G. (2015). Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 8(9), 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9995-3>
- Scallan, E., Hoekstra, R., Angulo, F. J., Tause, R. V., Widdowson, M. A., & Roy, S. L. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17(1), 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Shao, Q., Deng, Y., Shen, H., Fang, H., & Zhao, X. (2011). Optimization of polysaccharides extraction from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 958-962. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.08.015>
- Sheng, Z. -L., Wan, P. -F., Dong, C. -L., & Li, Y. -H. (2013). Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 43(1), 778-786. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.020>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. M., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sithisarn, P., Nantateerapong, P., Rojsanga, P., & Sithisarn, P. (2016). Screening for antibacterial and antioxidant activities and phytochemical analysis of *Oroxylum indicum* fruit extracts. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21040446>
- Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104, 1106-1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.019>
- Sun, K., Hu, Y. H., Zhang, X. H., Bai, F. F., & Sun, L. (2009). Identification of vhhP2, a novel genetic marker of *Vibrio harveyi*, and its application in the quick detection of *V. harveyi* from animal specimens and environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1251-1257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04304.x>
- Sun, Y. -X., Liu, J. C., & Kennedy, J. F. (2010). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff.: Fr.) O.K. Miller by Box-Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*. 82(1), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.076>
- Sung, H. H., Hsu, S. F., Chen, C. K., Ting, Y. Y., & Chao, W. L. (2001). Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio communities* in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture*, 192(2-4), 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00458-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00458-0)
- Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1279-1286. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.004>
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., & Karoglan Kontić, J. (2016). Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. *Phytochemical Analysis*. 27(1), 13-22. <https://doi.org/10.1002/pca.2582>
- Trang, Đ. T. X., Anh, V. T. T., Linh, T. C., & Tiên, N. T. C. (2020). Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết từ cây Núc Nác (*Oroxylum indicum* L.). *TNU Journal of Science and Technology*, 225(08), 3-10. <http://jst.tnu.edu.vn/jst/article/view/2921/0>
- Trang, Đ. T. X., Oanh, N. T. T., Linh, T. C., Thảo, L. T. P., Mến, T. T., & Tuấn, N. T. (2019). Đánh giá khả năng kháng oxy hóa, ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các cao chiết từ lá cây núc nác (*Oroxylum indicum* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(6A), 29-36. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.155>
- Wang, Y., Gao, Y., Ding, H., Liu, S., Han, X., Gui, J., & Liu, D. (2017). Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 218, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.058>
- Wu, J., Wu, Y., & Yang, B. B. (2002). Anticancer activity of *Hemsleya amabilis* extract. *Life sciences*, 71(18), 2161-2170. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02013-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02013-1)
- Yaquba, M. S., Bushra, B., & Aslam, R. (2020). Secondary metabolites of the genus *Crotalaria* (Rattlepods) and their medicinal importance-a review. *Journal of Horticultural Science and Technology*, 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.46653/jhst20030101>
- Zhang, Q. -W., Lin, L. -G., & Ye, W. -C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>