

ẢNH HƯỞNG CỦA SIÊU ÂM, VI SÓNG ĐẾN QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT THU NHẬN TERPENOIDS TỪ *Cyperus esculentus* VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN

Lương Ngọc Bích Trâm, Nguyễn Thị Hải Hòa, Hoàng Thị Ngọc Nhơn*

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: nhonhtn@huitt.edu.vn

Ngày nhận bài: 02/01/2025; Ngày nhận bài sửa: 08/02/2025; Ngày chấp nhận đăng: 12/02/2025

TÓM TẮT

Terpenoids trong thực vật đem lại nhiều công dụng giàu tính sinh học, bao gồm các công dụng như kháng viêm sơ bộ, kháng oxy và kháng các loài vi khuẩn cùng với nhiều lợi ích khác. Nghiên cứu này hướng đến việc thu nhận terpenoids từ cây củ gấu (*Cyperus esculentus*) thông qua hai phương pháp: chiết xuất được thực hiện dưới tác động của vi sóng (MAE) và sóng siêu âm (UAE), đồng thời đánh giá khả năng chống vi khuẩn của dịch chiết xuất. Mục tiêu là đánh giá và so sánh hiệu suất chiết xuất giữa hai phương pháp trong việc thu hồi hàm lượng terpenoids từ loài *C. esculentus*. Ngoài ra, hai phương pháp siêu âm và vi sóng đã cho thấy, giảm đi mức tiêu hao năng lượng và rút ngắn được thời gian thử nghiệm. Đây được xem là kỹ thuật chiết xuất xanh đầy triển vọng, mở ra khả năng ứng dụng phổ biến trong việc thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nhiều loại thực vật khác nhau. Đối với phương pháp chiết bằng vi sóng, khi tiến hành quá trình trích ly ở tỉ lệ nguyên liệu so với dung môi 1/20 (w/v), kết hợp với công suất vi sóng 360 W và thời gian xử lý chiếu vi sóng là 2 phút, lượng terpenoids đạt được $83,37 \pm 0,97$ mg/gck. Công suất (%) và thời gian (phút) của quá trình siêu âm là các yếu tố được nghiên cứu nhằm tối ưu hóa việc thu nhận hàm lượng terpenoids. Từ kết quả thí nghiệm, ở mức công suất 25% và thời gian 9 phút, lượng terpenoids đạt được $78,79 \pm 1,00$ mg/gck. Terpenoids có tính ức chế đối với các vi khuẩn, điển hình như các loài Gram âm (*E. coli*, *Salmonella*) và Gram dương (*S. aureus*, *B. subtilis*).

Từ khóa: *Cyperus esculentus*, terpenoids, vi sóng, siêu âm, kháng khuẩn.

1. MỞ ĐẦU

Cyperus esculentus là một loại dược liệu sống lâu năm, phát triển từ hệ thống thân rễ có củ nằm dưới lòng đất. Loài này còn hay được dân gian kêu là củ gấu vàng hoặc hạt cọ. Bên cạnh đó, nó chứa các hợp chất mang nhiều công dụng quý khác nhau, bao gồm tính kháng khuẩn, kháng khối u và kháng oxy hóa, chẳng hạn như acid hữu cơ, alkaloid, phenol, terpenoids, anthraquinone, steroid [1]. Chukwuma và cộng sự (2010) đã chứng minh các hợp chất chiết xuất từ *C. esculentus* có thể giúp thúc đẩy việc lưu thông tuần hoàn máu, phòng ngừa căn bệnh tim và huyết khối và làm giảm nguy cơ mắc ung thư đại tràng [2].

Là một trong những nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng và phong phú nhất ở thực vật, terpenoids có khoảng 25.000 loại hợp chất. Cấu trúc terpen bao gồm một hoặc nhiều đơn vị năm carbon có thể được chia thành sesquiterpen, monoteren, diterpen, triterpen, tetraterpen và polyterpen cao theo số lượng đơn vị năm carbon [3]. Terpenoids hiện diện ở nhiều dạng khác nhau trong các cấu trúc hóa học thuộc nhóm hydrocarbon tuyến tính thông thường hoặc nhóm carbon vòng bất đối xứng với các biến đổi hóa học khác nhau như hydroxyl, ketone, aldehyde và nhóm peroxyde. Các hợp chất terpenoids khác nhau đã được công bố là có kháng vi khuẩn, hạ đường huyết, kháng nấm mốc, chống dị ứng, chống ký sinh trùng, chống viêm, chống co thắt, điều hòa miễn dịch [4]. Terpenoids bao gồm hai thành phần chính là monoteren và sesquiterpen. Các hợp chất này mang lại nhiều công dụng sinh học đa dạng, như khả năng ngăn cản sự sinh trưởng của tế bào ung thư, đồng thời thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng virus. Ngoài ra, các loại terpenoids khác, chẳng hạn như diterpen và triterpen, thường ít thấy trong tinh dầu. Terpenoids là hợp chất có một hoặc nhiều trung tâm lập thể, tồn tại ở dạng enantiomer

trong tinh dầu với các enantiomer có các hoạt động sinh lý học riêng biệt. Chẳng hạn, (+) α -pinene và (-) α -pinene có hoạt tính sinh học khác nhau. Đối với (-) α -pinene thể hiện khả năng chống virus mạnh còn (+) α -pinene có tính ức chế các loài vi khuẩn thông thường và kháng viêm sơ bộ [5].

Việc thu nhận terpenoid trước đây chủ yếu áp dụng các kỹ thuật chiết xuất bằng dung môi, thường tốn khá nhiều thời gian và hiệu quả chưa cao. Việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến ngày càng được phát triển, như sóng siêu âm và vi sóng, nhằm nâng cao khả năng thu nhận hàm lượng terpenoids cao hơn từ dịch chiết. Khi lựa chọn phương pháp chiết xuất, cần dựa trên khả năng thu hồi hàm lượng terpenoids cao và duy trì hoạt tính sinh học của các hợp chất thu được. Theo nghiên cứu của García-Sarrió và cộng sự, việc sử dụng phương pháp trích ly có hỗ trợ vi sóng đã dẫn đến thu được terpenoids với hoạt tính sinh học cao hơn [6]. Ngoài ra, dựa trên nghiên cứu của Dai và cộng sự, phương pháp chiết xuất được hỗ trợ bởi vi sóng và siêu âm là hai kỹ thuật cho thấy hiệu suất vượt trội so với việc áp dụng phương pháp chiết xuất ngâm tĩnh [7]. Vì thế, nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá và so sánh khả năng thu nhận terpenoids khi có sự hỗ trợ của sóng siêu âm và sóng vi sóng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Củ của cây củ gấu (*C. esculentus*) được thu hoạch ở huyện Hóc Môn (Thành phố Hồ Chí Minh) vào tháng 9 năm 2023, khi cây đã rụng hết hoa. Sau khi thu nhận, củ được vận chuyển đến Trung tâm Thí nghiệm thực hành. Mẫu nguyên liệu sau khi thu thập được chọn lọc để loại bỏ các củ hư hỏng, được rửa sạch. Tiếp đó, nguyên liệu được cắt khoảng 0,5 cm và sấy khô ở 60 °C (tốc độ gió 1 m/s) trong 10 giờ để thu được nguyên liệu có độ ẩm dưới 10% độ ẩm. Sau khi sấy, nguyên liệu được nghiền, sau đó rây qua lưới chuẩn 80 mesh để đảm bảo kích thước hạt đồng đều. Mẫu bột thu được được đóng gói trong túi PE/zip chuyên dụng và bảo quản ở 5 °C phục vụ cho các thực nghiệm tiếp theo.

Vi nấm sử dụng trong thí nghiệm là bảng vi nấm 96 giếng trong suốt làm từ polystyren của hãng Aptaca (Ý). Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn được sử dụng bao gồm *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* ATCC 29890 và *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hóa chất

Ethyl acetate (99,5%, Trung Quốc), ethanol (99,5%, Việt Nam), acid perchloric (70%, Merck), acid acetic (99,5%, Trung Quốc), vanillin (99%, Merck), acid ursolic (99%, Sigma).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng của công suất và thời gian siêu âm đến hàm lượng terpenoids

Ảnh hưởng của công suất đến việc thu nhận terpenoids

Cân chính xác 1 g bột mẫu nguyên liệu vào mỗi cốc thủy tinh dung tích 100 mL. Sau đó, ethanol 50% được bổ sung theo tỷ lệ 1/20 (w/v), khuấy đều để đảm bảo mẫu được phân tán đều trong dung môi ethanol. Công suất siêu âm sử dụng thiết bị VC 750 Sonic (Mỹ) được điều chỉnh lần lượt ở các mức 20%, 25%, 30%, 35% và 40%, và được giữ cố định trong 5 phút. Tiếp theo, các mẫu được giữ ở nhiệt độ ổn định 60 °C trong 60 phút. Sau đó, ly tâm hỗn hợp bằng thiết bị Hermle Z206A (Mỹ) với tốc độ 5.000 vòng/phút và thời gian 15 phút, sau đó lọc chân không để thu dịch lọc. Xác định hàm lượng terpenoids tổng (TTC) trong dịch chiết bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis tại bước sóng 548 nm, dựa trên phương pháp của Ghorai. TTC được biểu thị bằng mg acid ursolic trên mỗi gam chất khô (mg/gck). Mỗi thí nghiệm tiến hành lặp lại 3 lần [8].

Ảnh hưởng của thời gian đến việc thu nhận terpenoids

Cân chính xác 1 g bột mẫu vào cốc thủy tinh dung tích 100 mL. Bổ sung ethanol 50% làm dung môi theo tỷ lệ 1/20 (w/v), mẫu bột nguyên liệu và dung môi được hòa quyện. Thời gian tiến hành khảo sát ở các mốc 3, 5, 7, 9, và 11 phút, với công suất từ kết quả thử nghiệm trước đó. Tiếp theo, các mẫu được giữ ở nhiệt độ ổn định trong bể điều nhiệt Memmert WNB10 (Đức) ở 60 °C trong 6 phút. Sau đó, đem ly tâm hỗn hợp thu được bằng máy Hermle Z206A (Mỹ) với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 15 phút, sau đó lọc qua giấy lọc chân không 0,45 μ m để thu phần dịch trong. Tiến hành xác định hàm lượng terpenoids (TTC) trong dịch chiết bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng 548 nm như đã nêu.

2.2.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng terpenoids có sự hỗ trợ của vi sóng

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến việc thu nhận terpenoids

Chuẩn bị chính xác 1 g bột mẫu nguyên liệu vào các cốc thủy tinh dung tích 100 mL. Tiếp đó, thêm ethanol 50% làm dung môi và khuấy đều hỗn hợp để bột phân tán hoàn toàn trong dung môi. Tỷ lệ nguyên liệu so với dung môi (w/v) được điều chỉnh ở các mức 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, và 1/30. Quá trình chiết xuất được tiến hành bằng lò vi sóng (Sharp 900VNS – Việt Nam), với công suất 270 W trong 2,5 phút. Sau đó, mẫu được giữ ở nhiệt độ ổn định 60 °C trong 60 phút, sử dụng thiết bị điều nhiệt (Memmert WNB10 – Đức). Mẫu tiếp tục được xử lý bằng máy ly tâm Hermle Z206A của Mỹ, vận hành ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch sau khi ly tâm được lọc chân không để thu dịch trong. Cuối cùng, tiến hành xác định hàm lượng terpenoids (TTC) trong dịch chiết bằng phương pháp đo quang phổ như đã nêu.

Ảnh hưởng của công suất đến việc thu nhận terpenoids

Cân 1 g bột nguyên liệu cho vào mỗi cốc có dung tích 100 mL. Sau đó, sử dụng ethanol 50% làm dung môi được bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đã thiết lập trong thử nghiệm. Khuấy kỹ để đảm bảo dung môi và bột nguyên liệu hòa trộn đồng nhất. Công suất vi sóng sử dụng (máy Sharp 900VNS – Việt Nam) được khảo sát ở các mức 180, 270, 360, 450 và 540 W, và được giữ cố định trong 2,5 phút. Sau khi mẫu được chiếu vi sóng, các mẫu được giữ ổn nhiệt ở 60 °C trong 60 phút bằng thiết bị (Memmert WNB10 – Đức). Tiếp theo, ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 15 phút (sử dụng máy Hermle Z206A – Mỹ), sau đó lọc chân không để lọc lấy phần dịch trong. Xác định hàm lượng terpenoids (TTC) trong mẫu dịch chiết bằng phương pháp đo quang phổ như đã mô tả.

Ảnh hưởng của thời gian đến việc thu nhận terpenoids

Cân 1 g bột nguyên liệu cho vào mỗi cốc có dung tích 100 mL. Sau đó, tiến hành bổ sung dung môi ethanol 50% phù hợp với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi đã xác định trong thí nghiệm. Hỗn hợp được khuấy đều nhằm đảm bảo sự đồng nhất giữa dung môi và bột nguyên liệu. Thời gian vi sóng lần lượt ở mức như sau: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 phút với công suất vi sóng cố định như trong thí nghiệm. Sau khi chiếu vi sóng, các mẫu được duy trì ở nhiệt độ ổn định 60 °C trong 60 phút trong thiết bị bể ổn nhiệt (Memmert WNB10 - Đức). Tiếp đến, hỗn hợp được ly tâm bằng thiết bị Hermle Z206A của Mỹ với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 15 phút và tiếp tục thực hiện lọc chân không nhằm thu nhận phần dịch trong. Hàm lượng terpenoids (TTC) trong mẫu dịch chiết được xác định theo phương pháp đã đề cập trước đó.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn thông qua phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Pha loãng mẫu dịch trích thu được từ phương pháp trích ly có hàm lượng cao nhất ở nhiều nồng độ khác nhau để xác định tính kháng khuẩn đối với *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* và *Salmonella*. Khả năng kháng khuẩn của terpenoids được đánh giá thông qua phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Quá trình pha loãng được thực hiện bậc hai từ nồng độ ban đầu 400 µg/mL trong môi trường nước. Vi khuẩn được nuôi cấy trong 24 giờ và mật độ được điều chỉnh xuống 10^6 CFU/mL. Để thực hiện thí nghiệm, hút 50 µL dung dịch vi khuẩn và 50 µL dung dịch terpenoids pha loãng ở nhiều nồng độ vào từng giếng của đĩa thí nghiệm. Giếng đối chứng bao gồm dịch khuẩn và môi trường nuôi cấy mà không có terpenoids. Mỗi nghiệm thức được tiến hành với ba lần lặp lại. Các đĩa được ủ trong điều kiện nhiệt độ 37 °C trong suốt 24 giờ. Sau thời gian ủ, thêm vào mỗi giếng 30 µL dung dịch resazurin 0,015% và tiếp tục ủ ở 37 °C để theo dõi sự màu sắc biến đổi [9]. Mẫu đối chứng âm sử dụng dung môi pha loãng mẫu thay cho mẫu dịch chiết xuất và mẫu đối chứng dương được thực hiện với thuốc ampicillin.

2.3. Phương pháp xác định tổng hàm lượng terpenoids

Quá trình thực hiện xây dựng đường chuẩn với chất chuẩn là acid ursolic, được sử dụng để đo nồng độ từ 100 đến 1.000 µg/mL. Chuẩn bị 200 µL dung dịch mẫu cho mỗi ống nghiệm, sau đó bổ sung 300 µL dung dịch vanillin 5% pha trong acid acetic cùng với 1 mL HClO₄ đậm đặc. Tiếp theo, mẫu được giữ ở nhiệt độ 70 °C trong 15 phút trong điều kiện tối. Sau giai đoạn này, dung dịch được chuyển sang bình định mức 10 mL bằng ethyl acetate và tiến hành đo hàm lượng terpenoids thông qua quang phổ tại bước sóng 548 nm. Đối với mẫu trắng, dung môi ethanol 50% được sử dụng thay thế cho mẫu và được thực hiện theo cùng một quy trình. Giá trị mật độ quang (OD) thu được sẽ được dùng để thiết lập đường chuẩn, mẫu nghiên cứu được phân tích bằng phương pháp quang phổ để xác định hàm lượng

terpenoids, với bước sóng lựa chọn là 548 nm [8]. Hàm lượng terpenoids được tính theo khối lượng trên g chất khô (mg/gck) bằng công thức:

$$\text{Hàm lượng terpenoids (mg/gck)} = \frac{C.n.V.100}{M.(100-h)}$$

Trong đó: C là tổng hàm lượng terpenoids theo acid ursolic (mg/gck), V là thể tích dung môi dùng để trích ly (mL); M là khối lượng nguyên liệu trích ly (g); n là hệ số pha loãng và h là độ ẩm mẫu (%).

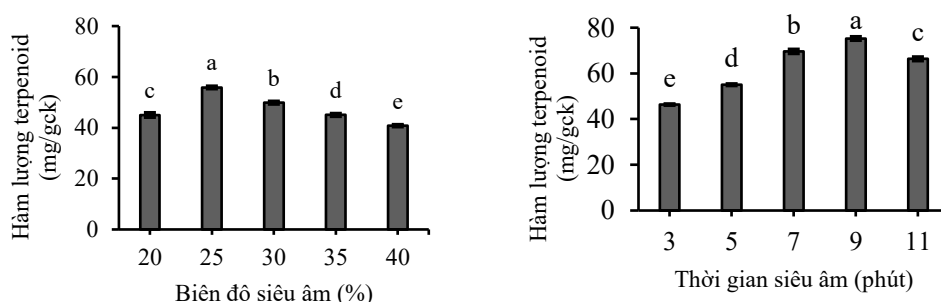
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ba lần một cách độc lập. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình kèm theo độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Phân tích phương sai ANOVA được tiến hành bằng phần mềm Minitab 19 để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu. Các biểu đồ được tạo ra bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tác động của công suất và thời gian siêu âm lên hàm lượng terpenoids

Công suất là một trong những yếu tố then chốt ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chiết xuất, vì nó thể hiện mức năng lượng được truyền vào chất lỏng có đủ hiệu quả để thu nhận terpenoids hay không. Công suất siêu âm càng cao thì khả năng phá vỡ cấu trúc của thực vật càng lớn, nhờ vào hiệu ứng cắt và sự nhiễu loạn do sóng siêu âm tạo ra. Bên cạnh đó, thời gian tiến hành chiếu sóng siêu âm cũng quan trọng trong toàn bộ việc chiết xuất, vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ tiếp xúc bề mặt giữa các chất [10]. Tỷ lệ rắn - lỏng cũng là một trong những yếu tố tác động mạnh mẽ đến hiệu quả của quá trình chiết xuất. Thể tích sử dụng cần phải đủ để đảm bảo toàn bộ khối lượng nguyên liệu được ngập hoàn toàn trong dung môi, đặc biệt là khi mẫu nở ra trong quá trình chiết xuất. Tuy nhiên, khi tỷ lệ rắn và chất lỏng vừa phải, có thể thúc đẩy tốc độ khuếch tán của các chất tan và làm cho nhiều terpenoids hơn đi vào dung dịch, trong khi việc sử dụng nhiều dung môi hơn sẽ gây ra chi phí cao hơn. Trong quá trình chiết xuất hỗ trợ siêu âm, tỷ lệ rắn/lỏng là thông số chi phối đáng kể hiệu quả truyền năng lượng siêu âm, chênh lệch nồng độ và tốc độ chuyển khối của chất tan vào dung môi [11].



Hình 1. Kết quả khảo sát chiết xuất terpenoids có hỗ trợ siêu âm
Đối với từng yếu tố khảo sát, các ký tự khác nhau (a, b, c...) trên mỗi cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thử (ANOVA, p < 0,05).

Trong khảo sát đơn yếu tố, hiệu suất thu nhận terpenoid tăng khi tỷ lệ rắn/lỏng giảm từ 1:10 xuống 1:50 (w/v), tương ứng với sự gia tăng lượng dung môi. Tuy nhiên, việc sử dụng thể tích dung môi quá lớn làm tăng chi phí và giảm tính thực tiễn của quy trình. Do đó, tỷ lệ rắn/lỏng 1:20 (w/v) được lựa chọn cho các thí nghiệm siêu âm tiếp theo nhằm cân bằng giữa hiệu suất thu nhận và mức tiêu thụ dung môi. Kết quả này phù hợp với nhận định rằng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu cần được tối ưu riêng theo nền nguyên liệu, dung môi và điều kiện siêu âm; chẳng hạn, Vo và cộng sự (2023) xác định tỷ lệ lỏng/rắn 40 mL/g là phù hợp để thu nhận terpenoid từ rễ *Abelmoschus sagittifolius* [12]. Tác động của công suất và thời gian siêu âm đến hàm lượng terpenoids trong chiết xuất được minh họa trong Hình 1.

Phương pháp chiết xuất có sử dụng sóng siêu âm giúp nâng cao hiệu suất thu nhận với mục đích nhằm rút ngắn quá trình thu nhận terpenoids. Khi công suất siêu âm tăng, các bọt khí trong dung môi được nén chặt, từ đó dẫn đến việc áp suất tăng và nhiệt độ lên cao, phá vỡ các bong bóng khí. Nhờ vào hiện

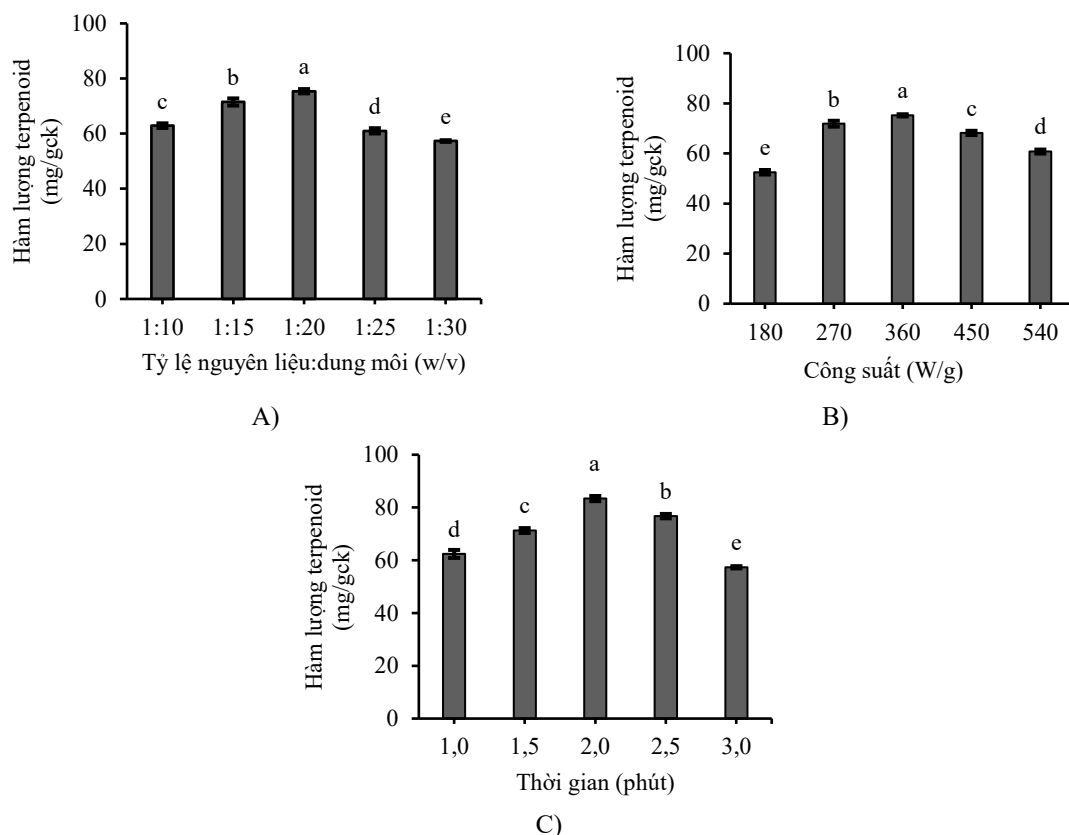
tượng này, các chất nội bào bên trong nguyên liệu được thoát ra bên ngoài dung môi. Khi công suất càng lớn thì khả năng xâm thực khí càng mạnh, dẫn đến phá vỡ các thành tế bào nhiều hơn, từ đó nâng cao được hiệu suất chiết xuất tăng cao [13]. Trong quá trình thực nghiệm, hàm lượng terpenoids bị ảnh hưởng trực tiếp bởi công suất siêu âm. Kết quả nhận thấy biên độ siêu âm từ 20% đến 25% (thiết bị có công suất tối đa 750 W) thì hàm lượng terpenoids tăng lên và biên độ siêu âm trên 25% thì hàm lượng terpenoids càng giảm xuống, biên độ siêu âm ở 25% thì hàm lượng terpenoids đạt được $55,87 \pm 0,4$ mg/gck, nhưng khi biên độ siêu âm vượt quá 30% xu hướng hàm lượng terpenoids giảm dần khi biên độ đạt 40% thì hàm lượng terpenoids chỉ còn $40,83 \pm 0,32$ mg/gck. Việc này có thể giải thích rằng rung động siêu âm ở biên độ cao có thể gây ra sự phá vỡ màng plasma của tế bào thực vật, sự khuếch tán và giải phóng terpenoids tăng [14]. Việc tăng cường biên độ siêu âm dẫn đến sự gia tăng số lượng bọt tạo ra, điều này dẫn đến sự kết hợp của bọt, làm biến dạng và nở không đối xứng, làm giảm tác dụng phá hủy của chúng lên thành tế bào của thực vật. Thêm vào đó, mức độ cao của các gốc tự do khác xảy ra trong việc phá vỡ bọt và làm suy yếu các phân tử phenolic và terpenoids, do đó giảm năng suất chiết xuất [15]. Tuy nhiên, đối với terpenoids là một hợp chất nhạy cảm với nhiệt, mặc dù biên độ tăng quá cao (> 30%) thì nhiệt độ tại tâm nguyên liệu tăng lên làm giảm đi việc thu nhận terpenoids [16]. Phân tích ANOVA cho thấy khi tăng biên độ từ 20% lên 30% dẫn đến sự tăng đáng kể hàm lượng terpenoids ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi biên độ vượt quá 30% thì hàm lượng terpenoids giảm đáng kể, vì vậy, điều kiện phù hợp của quá trình thu nhận terpenoids từ cây *C. esculentus* với biên độ là 25% cho ra hàm lượng cao nhất.

Hình 1B thể hiện khi khảo sát thời gian từ 3 đến 9 phút, hàm lượng terpenoids tăng đáng kể từ $43,50 \pm 0,55$ mg/gck lên $78,79 \pm 1,00$ mg/gck. Sự tăng hàm lượng terpenoids có thể lý giải rằng, khi kéo dài thời gian thì dẫn đến việc bề mặt giữa chất tan và dung môi tiếp xúc, các hợp chất hữu cơ có điều kiện thuận lợi để khuếch tán ra bên ngoài môi trường. Tuy nhiên, khi hàm lượng terpenoids là $65,65 \pm 0,82$ mg/gck ở thời gian 11 phút. Quá trình siêu âm kéo dài không phù hợp cho các hợp chất tự nhiên, khi thời gian càng lâu thì sóng siêu âm sẽ làm ảnh hưởng đến chính chất thu nhận trong quá trình trích ly [12]. Võ Tấn Phát và cộng sự (2024) đã chứng minh rằng các hoạt chất mang nhiều tính sinh học sẽ bị ảnh hưởng của nhiệt bởi hệ thống đầu dò siêu âm, kết quả cho thấy hiệu suất chiết xuất tăng cao nhưng khi thời gian quá lâu sẽ tác động đến hàm lượng và giảm hàm lượng của terpenoids [17]. Khi thời gian càng lâu, hàm lượng terpenoids sẽ bị giảm đi bởi việc sóng siêu âm sẽ phá vỡ đi cấu trúc của các chất, sóng âm sẽ tăng áp lực nén mạnh và làm giãn lên thành tế bào và làm cho sự biến đổi các hợp chất diễn ra nhanh hơn [17]. Kết quả phân tích biến động ANOVA cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu nghiên cứu ($p < 0,05$) về hàm lượng terpenoids ở thời gian khảo sát từ 3 phút đến 11 phút, với kết quả hàm lượng terpenoids cao nhất trong thời gian 9 phút. Như vậy, trong quá trình thu nhận terpenoids với thời gian phù hợp cho hàm lượng cao nhất là 9 phút.

3.2. Tác động của các yếu tố đến hàm lượng terpenoids thu nhận từ quá trình chiết xuất có hỗ trợ vi sóng

Tỷ lệ nguyên liệu so với dung môi có sự tương tác mạnh mẽ trong quá trình chiết xuất terpenoids. Ngoài ra, công suất và thời gian xử lý vi sóng cũng là yếu tố tác động chính đến việc thu hồi terpenoids. Tỷ lệ nguyên liệu với dung môi, công suất và thời gian tác động chiếu vi sóng được khảo sát nhằm để lựa chọn các yếu tố phù hợp cho quá trình chiết xuất terpenoids được hiển thị ở Hình 2.

Từ dữ liệu Hình 2A, với lượng thời gian 2,5 phút tỷ lệ tăng dần từ 1/10 đến 1/30 (w/v), hàm lượng terpenoids có xu hướng tăng khi tỷ lệ nguyên liệu và dung môi từ 1/10 chuyển sang 1/20 với bước nhảy 5 mL của dung môi. Tuy nhiên, khi tỷ lệ tăng lên 1/25, hàm lượng terpenoids lại giảm. Điều này cho thấy rằng dung môi có ảnh hưởng lớn đến quá trình chiết xuất: nếu tỷ lệ dung môi tăng cao, lượng terpenoids thu được sẽ giảm. Tại tỷ lệ 1/20, hàm lượng terpenoids đạt tối đa $79,39 \pm 0,78$ mg/gck, với sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% ($p < 0,05$) so với các tỷ lệ khác. Ngược lại, khi tăng tỷ lệ lên 1/25 (w/v), hàm lượng giảm còn $57,31 \pm 0,31$ mg/gck. Việc tăng công suất chiếu vi sóng góp phần làm nhiệt độ tăng và áp suất một cách có kiểm soát, thúc đẩy hiệu quả quá trình phá hủy thành tế bào thực vật. Điều này giúp giảm đáng kể các rào cản vật lý và cải thiện sự giải phóng chất tan từ ma trận thực vật, đồng thời tăng cường khả năng thẩm thấu của dung môi cũng như độ hòa tan của các chất tan [15]. Hàm lượng terpenoids sẽ ngừng gia tăng khi hỗn hợp đạt trạng thái cân bằng trong dịch trích. Lúc này, kết quả thu hồi hàm lượng terpenoids gây nên hao phí dung môi sử dụng, đồng thời hàm lượng terpenoids cũng bị ảnh hưởng bởi lượng dung môi quá lớn trong quá trình trích ly. Từ đó, chỉ ra rằng lượng dung môi càng nhiều khi tiếp xúc với các hợp chất tự nhiên càng lâu sẽ làm ảnh hưởng đến hàm lượng thu nhận terpenoids [18]. Như vậy, điều kiện tốt nhất cho thử nghiệm tiếp theo được xác định với tỷ lệ là 1/20 (w/v).



Hình 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (A), công suất (B) và thời gian (C) đến chiết xuất terpenoids có sự hỗ trợ vi sóng

Đối với từng yếu tố khảo sát, các ký tự khác nhau (a, b, c...) trên mỗi cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thử (ANOVA, $p < 0,05$).

Từ dữ liệu Hình 2A, với lượng thời gian 2,5 phút, tỷ lệ tăng dần từ 1/10 đến 1/30 (w/v), khi tỷ lệ nguyên liệu với dung môi tăng từ 1/10 lên 1/20 (w/v), với bước nhảy tỷ lệ dung môi là 5 mL, hàm lượng terpenoids có xu hướng tăng trưởng rõ rệt. Mặc dù vậy, khi lượng dung môi được tăng lên với tỷ lệ 1/25 (w/v), hàm lượng terpenoids lại giảm. Điều này cho thấy dung môi có ảnh hưởng lớn đến quá trình chiết xuất: khi tỷ lệ dung môi cao hơn, lượng terpenoids thu được sẽ ít hơn. Ở tỷ lệ dung môi 1/20 (w/v), hàm lượng terpenoids đạt mức cao nhất, cụ thể là $79,39 \pm 0,78$ mg/gck (sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%, $p < 0,05$ so với các tỷ lệ khác) nhưng khi ở tỷ lệ lên 1/25 (w/v) hàm lượng terpenoids giảm còn $57,31 \pm 0,31$ mg/gck. Việc tăng công suất chiếu vi sóng góp phần làm nhiệt độ tăng và áp suất một cách có kiểm soát, thúc đẩy hiệu quả quá trình phá hủy thành tế bào thực vật. Điều này giúp giảm đáng kể các rào cản vật lý và cải thiện sự giải phóng chất tan từ ma trận thực vật, đồng thời tăng cường khả năng thẩm thấu của dung môi cũng như độ hòa tan của các chất tan [19]. Hàm lượng terpenoids sẽ ngừng gia tăng khi hỗn hợp đạt trạng thái cân bằng trong dịch trích. Lúc này, kết quả thu hồi hàm lượng terpenoids gây nên hao phí dung môi sử dụng, đồng thời hàm lượng terpenoids cũng bị ảnh hưởng bởi lượng dung môi quá lớn trong quá trình trích ly. Từ đó, chỉ ra rằng lượng dung môi càng nhiều khi tiếp xúc với các hợp chất tự nhiên càng lâu sẽ làm ảnh hưởng đến hàm lượng thu nhận terpenoids [19]. Như vậy, điều kiện tốt nhất cho thử nghiệm tiếp theo được xác định với tỷ lệ 1/20 (w/v).

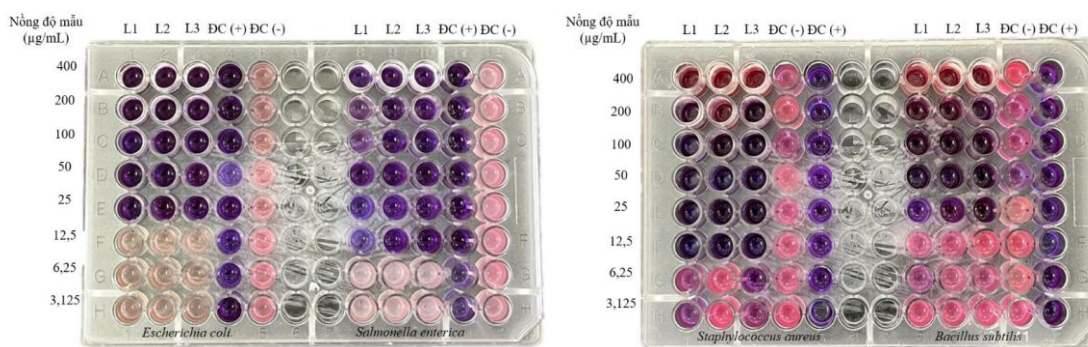
Yếu tố công suất của lò vi sóng cũng là một trong những yếu tố quan trọng tác động đến quá trình trích ly. Tùy thuộc vào mức công suất khác nhau, khả năng thẩm thấu cũng sẽ thay đổi, dẫn đến sự khác biệt trong chiết xuất thu nhận terpenoids, qua đó trực tiếp tác động đến quá trình chiết xuất thu terpenoids. Hàm lượng terpenoids dưới tác động của công suất vi sóng tăng dần từ mức 180 đến 540 W với bước nhảy 90 W và thu được hàm lượng terpenoids cao nhất khi công suất 360 W là $75,21 \pm 0,44$ mg/gck (Hình 2B). Trong khi đó, khi tăng công suất khi chiếu vi sóng vượt quá mức cân bằng thì hàm lượng terpenoids giảm xuống dần ở công suất 450 W và 540 W thì hàm lượng thu được lần lượt là $68,20 \pm 0,85$ mg/gck, $60,75 \pm 0,81$ mg/gck. Trong quá trình vi sóng, các tia vi sóng gây chuyển động mạnh

làm hỗn loạn các ion tổng dung môi, tạo ra áp lực trực tiếp trên tế bào của nguyên liệu. Từ đó, khi công suất hoạt động quá lớn, nó sẽ tác động trực tiếp đến các hợp chất hữu cơ, làm giảm hiệu quả trong việc thu hồi terpenoids [20]. Để đảm bảo không ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng terpenoids, mức công suất vi sóng được lựa chọn là 360 W tốt nhất cho các thí nghiệm tiếp theo.

Cùng với hai yếu tố tỷ lệ nguyên liệu : dung môi và công suất vi sóng, thời gian vi sóng cũng đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đáng kể đến khả năng thu hồi hàm lượng terpenoids. Kết quả thể hiện trong Hình 2C cho thấy hàm lượng terpenoids có xu hướng tăng dần từ khoảng thời gian 1,0 đến 2,0 phút, đạt mức cao nhất tại 2,0 phút với giá trị $83,37 \pm 0,97$ mg/gck và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Thời gian vi sóng kéo dài đến 2,5 và 3,0 phút thì hàm lượng thu hồi terpenoids giảm, trong đó giảm mạnh nhất ở 3,0 phút và hàm lượng terpenoids chỉ còn ở mức $57,34 \pm 0,44$ mg/gck. Thời gian chiếu vi sóng kéo dài tác động trực tiếp đến hàm lượng terpenoids trong quá trình thu nhận, vì khi thời gian tăng, ma sát gia tăng dẫn đến nhiệt độ cao hơn, khiến dung môi bay hơi. Cường độ công suất vi sóng tăng thì nhiệt độ trong mẫu cũng tăng lên. Vì thế, quá trình trích ly hoạt động hiệu quả nhờ sự tác động đồng thời của nhiệt độ và áp lực, làm các thành tế bào nguyên liệu bị vỡ ra, giúp các chất tan được giải phóng ra ngoài nhiều hơn. Tuy nhiên, nếu thời gian kéo dài hoặc nhiệt độ vượt quá ngưỡng cho phép, hàm lượng terpenoids có thể bị ảnh hưởng [20]. Như vậy, thời gian phù hợp cho việc thu nhận hàm lượng terpenoids cao là 2 phút.

3.3. Đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng phương pháp vi pha loãng giúp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với độ chính xác và hiệu quả cao [21]. Kết quả về MIC của các terpenoids thu được từ phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng vi ba được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. (A) Khả năng kháng khuẩn với *E. coli* và *Salmonella*,
(B) Khả năng kháng khuẩn với *S. aureus* và *B. subtilis* bằng phương pháp MIC

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định là nồng độ terpenoids cao nhất mà dung dịch vẫn giữ được màu xanh, hoặc là nồng độ pha loãng đầu tiên mà dung dịch chuyển sang màu hồng, cho thấy sự ức chế rõ rệt đối với sự phát triển của vi khuẩn. Các terpenoid đã được công nhận có tác dụng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn như *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* và *Salmonella*. Hình 3 cho thấy những giếng có thuốc thử resazurin không thay đổi màu từ xanh sang hồng có nồng độ mẫu thấp nhất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Đối với bốn chủng vi khuẩn đã thử nghiệm, nồng độ ức chế tối thiểu đối với *S. aureus* và *Salmonella* là 6,25 $\mu\text{g/mL}$, trong khi đối với *B. subtilis* và *E. coli* là 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Tính kháng khuẩn của các hợp chất thiên nhiên trong tinh dầu đã được ghi nhận ở mức tích cực, từ 128 đến 203,2 $\mu\text{g/mL}$ [21]. Nghiên cứu của Nikolic và cộng sự (2024) đã chỉ ra rằng tinh dầu oregano và cỏ xạ hương chứa các terpenoids có khả năng ức chế đa dạng trên các chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Kết quả nghiên cứu cho thấy terpenoid từ *C. esculentus* cũng có đặc tính kháng khuẩn tương tự, với mức dao động trong khoảng 128 đến 203,2 $\mu\text{g/mL}$. Quá trình chiết xuất terpenoid nhằm nâng cao giá trị kinh tế của cây củ gấu và ứng dụng trong các lĩnh vực y học, sinh học và thực phẩm chức năng.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp chiết xuất terpenoids từ *C. esculentus* có sự hỗ trợ của vi sóng cho hiệu quả cao hơn so với phương pháp chiết xuất bằng sóng siêu âm. Khi sử dụng dung môi với tỷ lệ 1/20 (w/v), công suất vi sóng 360 W và thời gian chiếu sóng 2 phút, phương pháp chiết xuất bằng vi sóng đạt được lượng terpenoids là $83,37 \pm 0,97$ mg/gck, vượt trội hơn so với phương pháp siêu âm với biên độ 25% trong thời gian 9 phút. Terpenoids thu được từ phương pháp này còn cho thấy khả năng ức chế hiệu quả đối với 4 chủng vi khuẩn, gồm *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* và *Salmonella*, thông qua phương pháp MIC, xác định nồng độ ức chế tối thiểu.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 186/HĐ-DCT ngày 31 tháng 08 năm 2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Yu *et al.*, "Tiger nut (*Cyperus esculentus* L.): nutrition, processing, function and applications", *Foods*, vol. 11, no. 4, p. 601, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/foods11040601>
- [2] E. R. Chukwuma *et al.*, "The phytochemical composition and some biochemical effects of Nigerian tigernut (*Cyperus esculentus* L.) tuber", *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 9, no. 7, pp. 709-715, 2010, doi: <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.709.715>
- [3] O. Ezech *et al.*, "Tiger nut oil (*Cyperus esculentus* L.): A review of its composition and physico-chemical properties", *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 116, no. 7, pp. 783-794, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300446>
- [4] Y. Taheri *et al.*, "*Cyperus* spp.: A review on phytochemical composition, biological activity, and health-promoting effects", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, p. 4014867, 2021, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/4014867>
- [5] Y. Wang *et al.*, "Recent progress in the extraction of terpenoids from essential oils and separation of the enantiomers by GC-MS", *Journal of Chromatography A*, vol. 1730, p. 465118, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465118>
- [6] M. J. Garcia-Sarrio *et al.*, "A new method for microwave assisted ethanolic extraction of *Mentha rotundifolia* bioactive terpenoids", *Electrophoresis*, vol. 39, no. 15, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.201800115>
- [7] B. Pavlic *et al.*, "Kinetics of microwave-assisted extraction process applied on recovery of peppermint polyphenols: experiments and modelling", *Plants (Basel)*, vol. 12, no. 6, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12061391>
- [8] A. Lukowski *et al.*, "Adaptation of a simple method to determine the total terpenoid content in needles of coniferous trees", *Plant Science*, vol. 314, p. 111090, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111090>
- [9] J. M. Andrews, "Determination of minimum inhibitory concentrations", *Journal Antimicrob Chemother*, vol. 48 pp. 5-16, 2001, doi: https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- [10] M. V. Rao *et al.*, "Ultrasonication - a green technology extraction technique for spices: A review", *Trends in Food Science & Technology*, vol. 116, pp. 975-991, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.006>
- [11] C. S. Dzah and A. Dzigbor, "Ultrasound assisted extraction: A relook at solvent to material ratio, its effects on process efficiency and how it can be exploited for different uses", *Journal of Food Process Engineering*, vol. 46, no. 7, p. e14339, 2023, doi: <https://doi.org/10.1111/jfpe.14339>
- [12] T. P. Vo *et al.*, "Ultrasonic-assisted and microwave-assisted extraction of phenolics and terpenoids from *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr roots using natural deep eutectic solvents", *ACS Omega*, vol. 8, no. 32, pp. 29704-29716, 2023, doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03929>
- [13] L. Paniwnyk *et al.*, "The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*", *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 299-301, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(00\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(00)00075-4)

- [14] K. Kumar *et al.*, "Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review", *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 70, p. 105325, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- [15] Võ Tấn Phát *et al.*, "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolics and terpenoids from sweet basil leaves using natural deep eutectic solvents", *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2024, no. 1, 2024, doi: <https://doi.org/10.1155/2024/5199884>
- [16] J. d. S. Matos *et al.*, "Ultrasound effects on fruit juice enzymes: a meta-analytic study for the polyphenol oxidase", *Observatório De La Economía Latinoamericana*, vol. 22, no. 6, 2024, doi: <https://doi.org/10.55905/oelv22n6-078>
- [17] Võ Tấn Phát *et al.*, "Optimization of ultrasonic and microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for enhanced recovery of phenolics and terpenoids from celery leaves", *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024, doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06246-1>
- [18] A. Nayak *et al.*, "Ultrasound and microwave assisted extraction of bioactives from food wastes: An overview on their comparative analysis towards commercialization", *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 124, p. 107712, 2026, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107712>
- [19] H. López-Salazar *et al.*, "Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review", *BioResources*, vol. 18, no. 3, p. 6614, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- [20] F. Zhang *et al.*, "Characterisation of flavoured sesame oil obtained from microwaved sesame seed by subcritical propane extraction", *Food Chem X*, vol. 21, p. 101087, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101087>
- [21] I. Nikolic *et al.*, "Anti-staphylococcus aureus activity of volatile phytochemicals and their combinations with conventional antibiotics against methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains", *Antibiotics*, vol. 13, no. 11, 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111030>

ABSTRACT

EFFECTS OF ULTRASOUND- AND MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION ON TERPENOID RECOVERY FROM *Cyperus esculentus* AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Lương Ngọc Bích Trâm, Nguyễn Thị Hải Hòa, Hoàng Thị Ngọc Nhơn*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Terpenoids from plants are a source of bioactivities, including antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory. This study focused on the recovery of terpenoids from *Cyperus esculentus* using microwave-assisted extraction (MAE), ultrasound-assisted extraction (UAE) and evaluation of the bioactivity of the extracts. The purpose of these two extraction methods was to compare the efficiency of terpenoids recovery from *C. esculentus*. In addition, this method demonstrated a significant reduction in energy consumption and processing time and was evaluated as effective for the recovery of bioactive natural organic compounds from plants. For the microwave-assisted extraction method with a material/solvent ratio of 1/20 w/v, a microwave power of 360 W, and a microwave time of 2 min, the terpenoids content was 83.37 ± 0.97 mg/gck. The two main factors investigated in the ultrasound-assisted extraction process were ultrasound power (%) and ultrasound time (min), the extraction efficiency was evaluated through the terpenoids content. The research results showed that, under the condition of 25% ultrasound amplitude and 9 min of ultrasound time, the terpenoids content reached 78.79 ± 1.00 mg/gck. Terpenoids have antibacterial properties against Gram-negative and Gram-positive strains such as *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, and *Salmonella*.

Keywords: *Cyperus esculentus*, microwave, terpenoids, ultrasound, antibacterial.